

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie



**Vliv methyl viologenu na produkci sekundárních metabolitů
v *in vitro* kultuře *Hypericum perforatum***

Rigorózní práce

Mgr. Kateřina Chreňová

Pověřen vedením katedry: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Datum odevzdání: 8. 10. 2018

Hradec Králové, 2018

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy



**The effect of methyl viologen on secondary metabolites production in
in vitro culture of *Hypericum perforatum***

Thesis

Mgr. Kateřina Chreňová

The head of the department: PharmDr. Tomáš Siatka, CSc.

Consultant: doc. PharmDr. Lenka Tůmová, CSc.

Date of handing: 8. 10. 2018

Hradec Králové, 2018

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Ráda bych poděkovala za odborné vedení při práci doc. PharmDr. Lence Tůmové, CSc. Dále PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D za technickou výpomoc a celé katedře farmakognozie za vstřícný přístup při vypracovávání práce. Děkuji Ing. Jindřichu Rejtharovi a Mgr. Ivetě Lužné za cenné rady a také mé rodině za nezbytnou podporu při studiu.

Obsah

1. OBSAH

2. POUŽITÉ ZKRATKY	7
3. ÚVOD	10
5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
6. TEORETICKÁ ČÁST	12
6.1 Třezalka tečkovaná (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	12
6.1.1 Taxonomie a botanický popis	12
6.1.2 Lékopisná droga	14
6.1.3 Obsahové látky	15
6.2 Explantátové kultury rostlin	23
6.3 Stresové faktory mající vliv na tvorbu a obsah sekundárních metabolitů	24
6.3.1 Abiotické faktory	25
6.3.2 Biotické faktory	28
6.4 <i>Hypericum perforatum</i> L. – <i>in vitro</i> elicitace	30
6.5 Methyl viologen	36
6.5.1 Obecná charakteristika methyl viologenu	36
6.5.2 Methyl viologen jako elicitor	37
6.5.3 Vliv methyl viologenu na lidský organismus	39
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
7.1 Pomůcky a přístrojové vybavení	42
7.2 Chemikálie	43
7.3 Kultivace kultur <i>Hypericum perforatum</i> L. – <i>in vitro</i>	45
7.3.1 Rostlinný materiál	45
7.3.2 Živné médium	45
7.3.3 Příprava kalusových a suspenzních kultur	46
7.4 Elicitace	47
7.4.1 Příprava elicatoru	47
7.4.2 Elicitace <i>in vitro</i> kultur u <i>Hypericum perforatum</i> L.	47

7.5	Stanovení obsahu	49
7.5.1	Příprava vzorků k analýze	49
7.5.2	HPLC analýza vzorků	50
7.5.3	Kalibrační křivky	51
7.5.4	Ukázka chromatogramu	54
7.6	Statistické zpracování dat	55
8.	VÝSLEDKY	57
8.1	Tabulky	58
8.2	Grafy	70
9.	DISKUSE	76
10.	ZÁVĚR	80
11.	POUŽITÁ LITERATURA	81
12.	PŘÍLOHY	91
12.1	Seznam obrázků	91
12.2	Seznam tabulek	92
12.3	Seznam grafů	93
12.4	Abstrakt	94
12.5	Abstract	95

2. POUŽITÉ ZKRATKY

Akt	proteinkináza B
ATP	adenosintrifosfát
AtPTR3	gen, z anlg. PTR-type peptide transporter gene, wound-induced peptide transporter
AUC	plocha pod křivkou, z angl. area under the curve
Bcl-2	genová rodina, z angl. B-cell lymphoma
BDNF	mozkový neurotrofický faktor, z angl. brain-derived neurotrophic factor
BV2	izolovaná buněčná linie imortalizovaných myších mikroglálních buněk
c-Src	protoonkogen
CatA	kataláza A
cDNA	komplementární DNA
CHC	kombinovaná hormonální kontracepce, z angl. combined hormonal contraceptives
CNS	centrální nervová soustava
COC	kombinovaná orální kontracepce, z angl. combined oral contraceptive pill
CYP	cytochrom P450
EbPS-A1	kyselý polysacharid izolovaný z <i>Epimedium brevicornum</i>
ELISA	imunochemická metoda, z angl. enzyme-linked immunosorbent assay
h	hodina
HaCa T	izolovaná buněčná linie lidských aneuoploidních imortalizovaných keratinocytů
HeLa	izolovaná buněčná linie lidského karcinomu děložního hrdla

HepG2	izolovaná buněčná linie lidského karcinomu jater
HP	heterochromatin protein
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high-performance liquid chromatography
hPPAR γ	lidské receptory aktivované proliferátory peroxizomů gama, z angl. human peroxisome proliferator-activated receptors gamma
Hypericin + S	hypericin tetrasulfonové kyseliny
IL-1 β	interleukin 1 beta
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemi, z angl. International Union of Pure and Applied Chemistry
JWA (ARL6IP5)	gen
LC3B	protein vázající mikrotubuly
LG2055	<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055
MAO-A	monoamin oxidáza A
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MCF-7	izolovaná buněčná linie lidského karcinomu prsu
MeOH	methanol
MFC	minimální fungicidní koncentrace
Mfn2	gen
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MLO	modulátor obrany a buněčné smrti
MPP ⁺	1-methyl-4-phenylpyridinium
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige a Skoog medium
MV	methyl viologen
MyD88	gen, z angl. myeloid differentiation primary response 88

NACA	sloučeniny kumulující se v nekrotické tkáni, z angl. necrosis-avid contrast agent
NFkB	nukleární faktor kappa B
Nrf2	nukleární faktor, z angl. nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
p53	tumor protein
p38	mitogenem aktivované proteinkinázy
PAL	fenylalanin ammonium lyáza
PCI	perkutánní koronární intervence
PGRMC	membránové komponenty progesteronového receptoru, z angl. progesterone receptor membrane components
PINK1	gen, z angl. PTEN-induced putative kinase 1
POP	prostagenní orální kontracepce, z angl. progestogen-only pill
PPARs	receptory aktivované proliferátory peroxizomů, z angl. peroxisome proliferator-activated receptors
PRU	P2Y ₁₂ reakční jednotky
RgPAL1	klon cDNA PAL
ROS	reaktivní formy kyslíku
SH-SY5Y	izolovaná buněčná linie lidského neuroblastomu
SN-38	aktivní metabolit irinotekanu
SRC-1	koaktivátor steroidního receptoru 1
SWAFR	jihozápadní australský floristický region
<i>t</i> -BOOH	tert-butyl hydroperoxid
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TT	třezalka tečkovaná
UV	ultrafialové záření
α -NAA	kyselina α -naftyl octová

3. ÚVOD

Kvalita a kvantita biologicky aktivních substancí z rostlin je obecně dlouhodobě řešený problém. Biotechnologické metody nám umožňují v určitých mezích extrahovat substance z kalusových a suspenzních kultur kvality odpovídající podmínkám kultivace. To nám dává produkt nezatížený těžkými kovy, pesticidy a případně i materiál prostý toxických látek, které mohou být přirozený produkt metabolismu dané rostliny.

Kvantitativně však míra metabolitů je nižší než v rostlině samotné. Proto je nutno množství obsahových látek uměle zvyšovat. K elicitaci se využívá například těžkých kovů. Nežádoucí vliv při následné aplikaci do lidského organismu se dá eliminovat správným výběrem tohoto kovu. To znamená použití prvku s kladným fyziologickým efektem, jako je selen nebo železo. Z jiných látek je možné k elicitaci využít herbicidy. Ty mohou být v polní kultuře potom cíleně použity nejenom na konkrétní plevel, ale i k navýšení biologicky aktivních substancí, pro něž je rostlina pěstována.

Princip elicitace je v přírodě běžným jevem, vyskytujícím se po expozici rostliny stresovému faktoru, jenž může být abiotického či biotického původu. Jako obranný mechanismus využívá rostlina zvýšenou produkci sekundárních metabolitů, které mají pro nás často významný fyziologický efekt.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zjistit vliv abiotického elicitoru methyl viologenu na produkci flavonoidů v kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. Po stanovení obsahu flavonoidů bylo jedním z dalších cílů zjistit účinnost elicitoru v různých koncentracích, a tudíž jak je v závislosti na koncentraci schopen ovlivňovat produkci těchto látek. Předmětem zájmu bylo také zjištění, zda kultury vylučují obsahové látky do živného média v průběhu kultivace.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum* L.)

6.1.1 Taxonomie a botanický popis

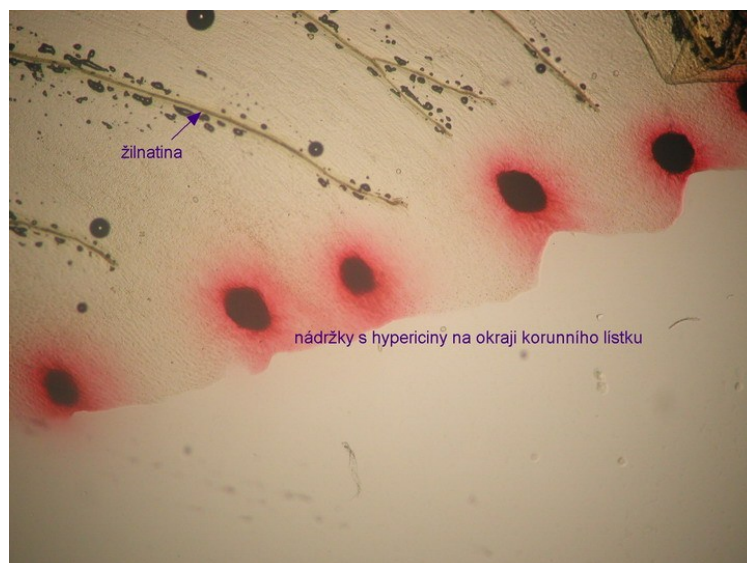
Hypericum perforatum L. se řadí do čeledi Hypericaceae Juss. (Clusiaceae = Guttiferae), třezalkovitě.^{1,2} Kromě *Hypericum perforatum* L. se v našich lokalitách také vyskytují další druhy: *H. humifusum* L., t. rozprostřená; *H. hirsutum* L., t. chlupatá; *H. pulchrum* L., t. pěkná; *H. montanum* L., t. horská; *H. elegans* Willd, t. ozdobná; *H. maculatum* Crantz, t. skvrnitá, a *H. tetrapterum* Fr., t. čtyřkřídla.²

Třezalka tečkovaná (TT) je vytrvalá bylina s přímou lodyhou vysokou 20 až 80 cm, která se ve vrchních partiích větví. Vstřícné celokrajné listy jsou charakteristicky tečkované – v mezofylu čepele jsou roztroušené průsvitné schizogenní sekreční dutiny, podél okraje jsou červeně zbarvené několikabuněčné žlázy (obsahují antrachinonový pigment hypericin). Cymózní květenství je tvořeno pětičetnými květy s rozlišeným kalichem a korunou. Semeník je trojpouzdrý s třemi volnými čnělkami a tyčinky jsou trojbratré. Tento druh se běžně vyskytuje v Evropě, západní a střední Asii a Severní Americe. Do té ale byla zavlečena.^{3,4}

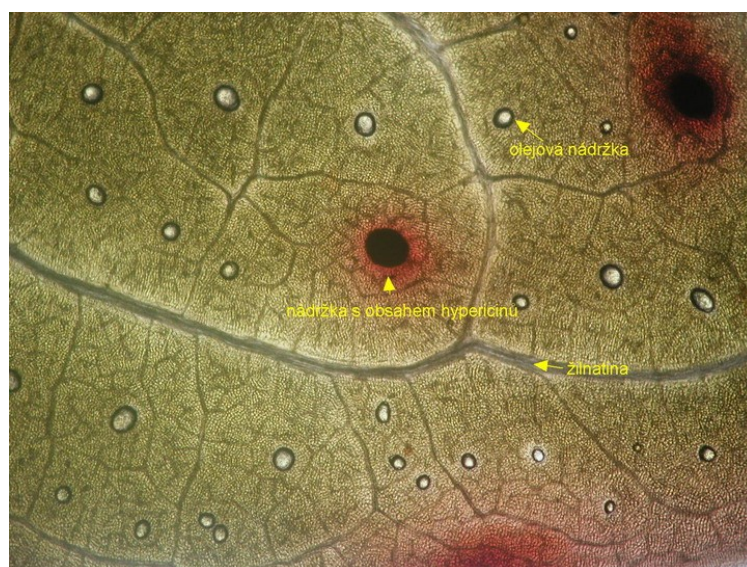
Obrázek 1 T. tečkovaná (*H. perforatum* L.), t. horská (*H. montanum* L.), t. chlupatá (*H. hirsutum* L.), t. rozprostřená (*H. humifusum* L.)⁵



Obrázek 2 Žlázy obsahující pigment hypericin v koruním listku ⁶



Obrázek 3 Žlázy obsahující pigment hypericin a sekreční dutiny v listu ⁷



6.1.2 Lékopisná droga

Lékopisnou drogou je pouze kvetoucí nať *Hypericum perforatum* L. obsahující nejméně 0,08 % hypericinů.⁸ Ve starších herbářích je zmínka, že lidově se sbírají všechny druhy třezalek u nás rostoucí, v novějších už panuje názor, že při sběru jiných druhů se léčivý účinek snižuje.^{4,9} *H. maculatum* Crantz., třezalka skvrnitá je pro drogu lékopisné kvality nepřijatelná.¹⁰

6.1.3 Obsahové látky

Třezalka tečkovaná obsahuje široké spektrum biologicky aktivních sloučenin. Jejich obsah kolísá v závislosti na genotypu, znečištění prostředí, jiných ekologických faktorech, době sklizně, přípravě a zpracování vzorku a skladovacích podmínkách. Pro nás významné biologicky aktivní látky jsou koncentrované v pupenech, květech a ve špičkách větvíček. I přes tuto variabilitu je obsah biologicky aktivních sloučenin v extraktu tvořen okolo 20 % aktivních látek.¹¹ Navzdory velkému množství druhů je hlouběji prozkoumán a užíván především druh TT (*Hypericum perforatum* L.). Je to komercializovaný druh, jehož extrakt je v Evropě široce využíván v léčbě mírné a středně závažné deprese. Biologicky aktivní substance jsou však i v jiných druzích tohoto rodu. Mezi biologicky aktivní sloučeniny vyskytující se v druzích rodu *Hypericum* patří hypericin, pseudohypericin, hyperforin, adhyperforin, chlorogenová, neochlorogenová, kávová a 2,4-dihydroxybenzoová kyselina, hyperosid, isokvercitrin, kvercitrin, kvercetin, avikularin, rutin, (+)-katechin, (-)-epikatechin, mangiferin, I3, II-8-biapigenin a amentoflavon.¹²

Hlavní obsahové látky můžeme rozdělit do několika skupin. První významnou skupinou jsou naftodianthrony s fotodynamickým účinkem a červeným zabarvením. Mezi naftodianthrony patří stabilní hypericin a jeho 2-methoxy derivát pseudohypericin a jejich nestabilní prekurzory protohypericin a pseuprotahypericin. Pseudohypericin je hlavní naftodiantronový derivát obsažený v TT. Hypericiny jsou odvozeny z metabolismu anthranoidních sloučenin a prekurzor těchto sloučenin je pravděpodobně emodinanthron.¹³ Naftodianthrony mají omezenou rozpustnost téměř ve všech rozpouštědlech. Hypericin i pseudohypericin jsou prakticky nerozpustné ve vodě při teplotě okolí, ale jejich rozpustnost stoupá se vzrůstající teplotou.¹⁴ Tudíž se skoro polovina obsaženého množství vyextrahuje během přípravy čaje ve vařící vodě.¹⁵

Klinický účinek je obvykle připisován skupině hypericinů, avšak bylo zjištěno, že samotný hypericin nemá vliv na inhibici monoaminoxidázy A (MAO-A)¹⁶, na rozdíl od celkového extraktu TT, jenž tuto aktivitu vykazuje.¹⁷

Další obsahové látky zvané floroglucinoly jsou také ve významné míře obsaženy v rodě *Hypericum*. Tyto sloučeniny jsou ale také široce rozšířeny v dalších taxonech: Rosaceae, Euphorbiaceae a Canabinaceae. Hlavní floroglucin nalezený ve třezalce je hyperforin a další adhyperforin, jenž se liší přídáním methylovou skupinou.¹⁸

Obě sloučeniny se vyskytují výhradně v reprodukčních částech rostliny, méně potom v květech a větší množství ve zralých plodech.¹⁹ Hyperforiny jsou lipofilní a nestabilní vůči teplu a světlu.²⁰

Největší skupina biologicky aktivních sloučenin v TT jsou flavonoidy se strukturním prvkem kvercetinem jako aglykonem. Obsah kolísá kolem 2–4 %. Hyperosid (hyperin) a rutin většinou dominují mezi glykosidy TT a jsou následovány kvercitrinem a isokvercitrinem.²¹

Biflavony jsou skupinou dimerních flavonů zřídka se vyskytujících v zeleninových zdrojích. Dvě sloučeniny tohoto typu, 3,8'-biapigenin a amentoflavon, byly nalezeny v TT v množství od 0,1 do 0,5 % a od 0,01 do 0,05 %.^{22,23}

V taninové frakci jsou v rostlině TT taktéž obsaženy proanthokyanidiny v množství 6,2–12,1 % surové drogy.²⁴

Ze skupiny fenyylpropanů byla z TT extrahována a detekována chlorogenová kyselina, ale v koncentraci pod 1 %.²⁵

Předmětem zájmu této práce jsou flavonoidy hyperosid a kvercetin a naftodianthron hypericin.

6.1.3.1 Účinky

Problémovým stavem u žen menopauzálního věku je nižší hladina estrogenů, jež může zapříčinit mnoho zdravotních komplikací, jako osteoporózu, zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob, ale i problémy v těhotenství a laktaci, zatímco zvýšená hladina estrogenů může být rizikový faktor, jenž podporuje proliferaci nádorových buněk. Proto se zkoumá estrogení aktivita přírodních látek, které by měly potenciál regulovat hladiny estrogenů a případně i být šetrnější alternativou ke klasické estrogení substituční terapii. Tyto fytoestrogeny napodobují 17 β -estradiol, díky své strukturální podobnosti se savčími estrogeny.²⁶ Proto byla zkoumána i estrogení aktivita hyperforinu a ve studii Kwon et al., 2016 byl popsán estrogení účinek a i buněčná proliferace v MCF-7 buňkách skrze estrogení receptor. Ve srovnání se 17 β -estradiolem byly oba efekty signifikantně slabší – estrogení aktivita i indukce rakovinných proliferujících buněk *in vitro*.²⁷

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) jsou podskupina nukleárních receptorů. hPPAR γ (human peroxisome proliferator-activated receptor gamma) je spojován s patologií mnoha onemocnění jako obezita, diabetes nebo rakovina. Aktivační test hPPAR γ založený na metodě ELISA ukázal, že biapigenin zvýšil vazbu mezi hPPAR γ a SRC-1 (koaktivátor steroidního receptoru 1) přibližně třikrát. Biapigenin vykazoval antikancerogenní aktivitu proti HeLa buňkám. Biapigenin byl netoxický vůči HaCa T buňkám. Data získaná v této studii naznačují, že biapigenin by mohl být potencionální agonista hPPAR γ s protinádorovou aktivitou. Potenciální protinádorová účinnost proti buňkám rakoviny děložního čípku bude nadále ještě zkoumána. Biapigenin byl pro experimentální účely extrahován ze *Selaginella tamariscina*, účinky by měly být dle autorů studie podobné s účinky TT.²⁸

Drtivá většina výsledků shrnutá v přehledu Jendželovská et al., 2016 naznačuje, že hypericin v podmínkách za světla nebo tmy může být velmi významné agens v léčbě a diagnóze rakoviny. Vedle dobře známé a intensivně zkoumané hypericinem zprostředkované fotodynamické terapie a diagnózy jsou zde ale také další nové a slibné přístupy v použití hypericinu, a to jako NACA (necrosis-avid contrast agent). Navíc některé testované modality, zahrnující duální targeting, mohou dokonce zlepšit klinický výstup léčby rakoviny. Avšak ve tmě může být hypericin zodpovědný za limitovanou účinnost konvenčně aplikované chemoterapie nebo dokonce fotodynamické terapie,

díky schopnosti indukovat některé ATP-vazebné kazetové transportéry. Navíc je zde podezření, že neaktivovaný hypericin má mnohem širší biologickou aktivitu.²⁹

Dále byla zkoumána antifungální aktivita hypericinu v porovnání s rozpustnou solí hypericin + S (hypericin tetrasulfonové kyseliny) a fagopyrinu na vybrané patogenní houby a kvasinky. Je známo, že používání extraktů rostlin komplikuje identifikaci antimikrobiální aktivity jednotlivých biologicky aktivních sloučenin. Proto ve studii byly stanoveny jednotlivé MIC (minimální inhibiční koncentrace) a MFC (minimální fungicidní koncentrace) pro jednotlivé sloučeniny a patogeny. Pro patogenní houby se minimální inhibiční koncentrace pohybovala pro hypericin 0,18–46,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, hypericin + S 0,18–750 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a pro fagopyrin 11,7–46,9 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Pro kvasinky se MIC pohybovala pro hypericin a hypericin + S okolo 0,18–46,9 a 0,011–0,73 $\mu\text{g ml}^{-1}$.³⁰

Léčba nádorů cisplatinou vede někdy k chemorezistenci. Dnes je částečně uznáno, že je způsobená induktivní expresí PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1) v ovariálních rakovinných buňkách. PGRMC1 zvyšuje autofagii, aktivuje cytochrom P450, má signální cesty pro podporu přežití buňky a redukuje účinky léčby. V této studii se dokládá první linie důkazů, že hyperosid inhibuje buněčnou životaschopnost, spouští autofagii a apoptózu v ovariálních rakovinných buňkách. Mechanisticky byl pro PGRMC1-dependentní autofagii využíván hyperosid k indukci apoptické buněčné smrti. Hyperosid indukoval konverzi LC3B-I na LC3B-II a formaci autofagosomů v ovariálních rakovinných buňkách. Zejména PGRMC1 kolokalizován s LC3B-II a zvýšená exprese PGRMC1 zlepšila hyperosidem indukovanou autofagii a apoptózu, zatímco utlumení PGRMC1 přerušilo činnost. Navíc Akt signalizace a Bcl-2 rodina byli také zapojeni v hyperosidem indukované autofagii a apoptóze. Hyperosid zvýšil citlivost buněk k léčbě cisplatinou u ovariálních rakovinných buněk rezistentních na cisplatinu, kde se vyskytovala zvýšená exprese PGRMC1. Proto by mohl být hyperosid v budoucnu potenciální komplementární terapií u terapie ovariálního karcinomu využívající léčbu založenou na cisplatině.³¹

Hyperosid byl také zkoumán z hlediska protektivního efektu na játra a plíce. Ve studii zkoumající preventivní vliv na rakovinu plic *in vitro* prostřednictvím indukce apoptózy a inhibice proliferace skrze kaspázu-3 a p53 signální cestu byl zjištěn pozitivní efekt, a to i *in vivo* u myšího modelu. Proto bude určitě předmětem zájmu dalších studií.³² V další studii byl histologicky a biochemicky ověřen ochranný efekt hyperosidu při chronické jaterní fibróze vyvolané tetrachlormethanem. Hyperosid a

syllimarín redukovaly histologické změny a tlumily patologický efekt tetrachlormethanu. Vedle toho hyperosid vykazoval antioxidační aktivitu *in vitro* a obnovil syntézu proteinu Nrf2, jenž byla po expozici tetrachlormethanem downregulována.³³ Prostřednictvím aktivace Nrf2 byl taktéž zjištěn pozitivní efekt na alergický zánět dýchacích cest indukovaný ovalbuminem na myším modelu. V tomto případě byl hyperosid získán z *Rhododendron brachycarpum*.³⁴

Extrakt a izolované sloučeniny TT vykazují neuroprotektivní efekt. Neuroprotektce může být dosaženo přímou akcí na jeden nebo více mechanismů, jako je antiapoptický efekt, nebo nepřímo skrze antioxidační vlastnosti. Sebraná data vypovídají o protektivním efektu jednotlivých sloučenin a jejich potenciálním využití při léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (celkový extrakt, kvercetin, rutin, hyperforin). Nicméně v budoucích studiích musí být plně pochopena a charakterizována aktivita těchto sloučenin a aktivita této rostliny. Chemický vztah mezi aktivitou a strukturou naznačuje, že vedlejší cukerný řetězec flavonoidů může být důležitý pro neuroprotektivní aktivitu.³⁵ Mnohočetné hydroxylové skupiny udělují těmto sloučeninám antioxidační vlastnosti.³⁶

Výsledky studie, kde byl zkoumán vliv hyperosidu na učení a paměť myší vystavených chronickému mírnému stresu, naznačují, že hyperosid zvrátil kognitivní poškození vyvolané působením chronického mírného stresu, jež je spojováno s regulací BDNF (brain-derived neurotrophic factor) signalizační cesty.³⁷

Ve studii Fan et al., 2017 byly BV2 mikrogliaální buňky předem ošetřeny hyperosidem a stimulovány lipopolysacharidem. Výsledky naznačují, že hyperosid významně inhiboval lipoproteinem indukovanou tvorbu oxidu dusnatého a prozánětlivých cytokinů zahrnující IL-1 β a TNF- α , stejně tak jako expresi indukovatelné syntázy oxidu dusnatého. Podobné výsledky byly zjištěny u primárních mikrogliaálních buněk izolovaných z neonatálních myší. Analýzy signalizace MAPK a NF κ B kombinované se specifickými inhibitory napovídají, že hyperosid tlumí lipoproteinem indukovanou zánětlivou odpověď skrze p38 a NF κ B cesty. Hyperosid potlačil neurotoxicitu zprostředkovanou reaktivními mikroglie, ale nebyl zaznamenán žádný přímý dopad na MPP⁺-indukovanou toxicitu v SH-SY5Y neuroblastomových buňkách. Předběžně mohou tato data naznačovat, že hyperosid může fungovat jako ochranný prvek potlačením aktivace mikroglie u poruch, jako je Parkinsonova choroba.³⁸

6.1.3.2 Interakce

Interakcím mezi metabolity rostlin a účinnými látkami léků je v současné době věnována velká pozornost. Interakční potenciál sekundárních metabolitů TT je známý a patří k jednomu z nejvýznamnějších. Dle systematického přehledu byly interakce TT a *Viscum album* shledány za nejzávažnější ze skupiny hodnocených drog. Tyto relevantní interakce ústily v projevy jako: rejekce transplantátů, opožděné probuzení z narkózy, kardiovaskulární kolaps, nefrotoxicita, hepatotoxicita, kardiotoxicita, bradykardie, hypovolemický šok, zánětlivá reakce s orgánovou fibrózou a smrt.³⁹

Mechanismem interakce u TT je především indukce CYP3A4 enzymů a/nebo intestinálního P-glycoproteinu. Z klinických výstupů byly zaznamenány: rejekce transplantátu, nechtěné těhotenství, mánie, orofaciální dystonie, opožděné probuzení z narkózy, kardiovaskulární kolaps. Dochází také k inhibici imunosupresiv (cyklosporin), antiretrovirotik, hormonální terapie, kardiovaskulárních léků, antineoplastik, léčiv ovlivňujících CNS a antibiotik. V systematickém přehledu byly hodnoceny studie, ve kterých byl aplikován vysokodávkový režim podávání extraktu hyperforinu (> 10 mg za den) a také nízkodávkový režim (<4 mg za den). Vysoké dávky vykazovaly indukci CYP3A. Při nízkých dávkách nebyl pozorován žádný významný vliv na CYP3A.⁴⁰

Při současném užívání snižuje TT koncentraci v krvi u látek: alprazolam, amitriptylin, bupropion, cyklosporin, digoxin, fexofenadin, glyklazid, imatinib, indinavir, irinotekan, metadon, midazolam, nevirapin, nifedipin, omeprazol, phenprocoumon, verapamil, warfarin, zolpidem. U paroxetinu a venlafaxinu může dojít k serotoninovému syndromu.⁴¹

TT ovlivňuje farmakokinetiku mnoha drog prostřednictvím indukce CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9 a P-glycoproteinu. Interakce může mít však i pozitivní charakter. Při aplikaci TT současně s klopido-grelem se zvyšuje odezva na léčbu klopido-grelem. Bylo potvrzeno, že TT může představovat validní možnost k vylepšení odezvy pacientů se stabilní ischemickou chorobou srdeční na léčbu klopido-grelem. Ti pacienti, kteří neodpovídají na klopido-grel v dávce 600 mg, byli randomizováni k užívání TT nebo placebo. TT užívali pacienti v dávce 300 mg třikrát denně po dobu dvou týdnů po perkutánní koronární intervenci (PCI). Reaktivita destiček byla posuzována před PCI a 2 a 4 týdny po PCI. Změny P2Y₁₂ reakčních jednotek (PRU) oproti výchozímu stavu

byly vyšší ve skupině s TT 2 týdny po PCI oproti placebo a s žádnými rozdíly ve skupinách po 4 týdnech. Reziduální reaktivita destiček byla vylepšena TT během prvního měsíce po PCI, což je nezranitelnější období se zvýšeným trombotickým rizikem.⁴² Lau et al., 2011 hodnotil zda TT zvyšuje farmakodynamickou odpověď klopidoogrelu. Hyporeaktivním jedincům byla aplikována TT (300 mg na den) po dobu 14 dní, následována jednotlivou dávkou 300 mg klopidoogrelu. TT snížila reaktivitu destiček a zvýšila inhibici destiček u pacientů po koronárním stentu hyporeaktivních na klopidoogrel.⁴³ Podobný efekt snížení reaktivity destiček byl pozorován u kuřáků. Tento „kuřácký paradox“ souvisí se zvýšenou aktivitou CYP1A2.⁴⁴

Další pozitivní efekt interakce mezi TT a léčivem byl zaznamenán u pacientů léčených irinotekanem. Dle studie byla míra myelosuprese podstatně vyšší u pacientů, jež neužívali současně s léčbou TT. Aktivní metabolit této účinné látky SN-38 byl při užití TT snížen o 42 %, což ale taky může mít negativní dopad na výsledný efekt léčby jako takové.⁴⁵

V další studii byla vyhodnocena interakce TT a cyklosporinu po několika kauzálních případech jako závažná. V případě jejich komedikace byla velmi rychle (3 dny po zahájení léčby) a významně (snížení více než o 40% AUC) změněna farmakokinetika u všech 11 pacientů, vyžadující opakované doplnění dávky cyklosporinu pro zajištění odpovídajícího terapeutického efektu imunosupresivní léčby. Ačkoli byla v této studii užita dávka 600 mg na den na rozdíl od doporučené dávky 900 mg na den pro konkrétní formulaci přípravku, bylo nutné navýšit dávku cyklosporinu téměř o 60 %. U 8 z 11 pacientů po přerušení léčebné komedikace extraktem TT přetrvával tento efekt více jak dva týdny.⁴⁶

Systematické review zmapovalo a shrnulo poznatky ze 48 vyhledaných článků, 4 studií a srovnalo samotné užívání kombinované orální kontracepce (COC) a užívání COC spolu s TT. Dvě studie nepotvrdily žádnou změnu v markrech pro ovulaci, ale jedna studie poukázala na zvýšený folikulární růst a pravděpodobně na ovulaci během užívání COC a TT zároveň. Tři studie poukázaly na zvýšené riziko intermenstruačního krvácení při souběžném užívání COC a TT. Tři studie taktéž poukázaly na změny alespoň v jednom farmakokinetickém parametru, který naznačoval signifikantní pokles expozice hormonální koncentrace při současném užívání COC a TT. Pouze jediná studie nerozpoznala žádné signifikantní změny ve farmakokinetických parametrech po aplikaci produktů TT s nízkým obsahem hypericinu. Riziko ovulace a

intermenstruačního krvácení vzbuzuje obavy, že dochází ke snížení účinku COC při současném užívání s TT, ale je nutno zohlednit limitovanou evidenci případů. Evidovaná farmakokinetická data jsou zmatená, ale naznačují, že podávání TT může souviset s mírnou indukcí metabolismu COC.⁴⁷ Dle předběžné studie Murphy et al., 2010 z Univerzity v Utahu by pacientky při užívání TT a aplikaci nouzové antikoncepce měly zvýšit dávku levonorgestrelu z 1,5 mg na 2,25 mg.⁴⁸ The United States Medical Eligibility Criteria for Contraceptive Use shrnula doporučení pro použití specifických kontracepčních metod užívaných určitými ženami a muži s konkrétními charakteristikami a zdravotním stavem. V těchto doporučeních mimo jiné zmínila i riziko užívání TT současně s kontracepčními léčivými. Jako teoreticky rizikové byly shodnoceny kombinace TT s COC, POP (progestagenní orální kontracepce), implantáty a CHC (kombinovaná hormonální kontracepce). Tyto kontracepční metody byly označeny v souvislosti s užitím TT v klasifikační kategorii hodnotou 2 = převažují teoretická nebo prokázaná rizika, ale klinická data jsou prozatím omezená. (1 = podmínka, pro kterou nejsou žádná omezení při současném užití s kontracepčními metodami. 3 = teoretická a prokázaná rizika většinou převyšují benefit ze současného užití s kontracepčními metodami. 4 = stav, který představuje nepřijatelné zdravotní riziko, pokud je kontracepční metoda v této kombinaci užitá.)⁴⁹ V doporučení z roku 2010 nebyla TT zahrnuta.⁵⁰

TT nemá signifikantní vliv na kinetiku karbamazepinu, ibuprofenu a theofylinu.⁵¹

6.2 Explantátové kultury rostlin

Explantátové kultury jsou součástí biotechnologických postupů, jež bývají různorodě využívány. V místech, kde je problematická *in situ* ochrana flóry, nastupují možnosti *ex situ* zachování druhu. Pro mnoho rostlinných druhů to je jediná možnost zachraňující před zánikem, a to prostřednictvím banky semen, žijící sbírky založené vegetativním množením a metody využívající tkáňové (*in vitro*) kultury. Rozvoj specifických *in vitro* protokolů je nezbytný pro úspěšné započetí linie dané kultury. Stejně tak významné je vyvinutí vhodného média, použití správných růstových regulátorů a zvolení co nejvhodnějších inkubačních podmínek k optimalizaci regenerace a zmnožení výhonků. Tato metoda byla například použita ve studii zabývající se Jihozápadním australským floristickým regionem (SWAFR).⁵² Tkáňovými kulturami z pohledu zachování rostlinného druhu se zabývala i studie Nalawade et al., 2004.⁵³ Ve studii Krishnan et al., 2011 bylo deset léčivých rostlin i opět zavedeno do jejich přirozeného prostředí.⁵⁴

Rostlinné tkáně a orgánové kultury byly extensivně využívány od počátku dvacátého století ke studiu a porozumění některých primárních biologických mechanismů jako je morfogeneze. Avšak se zvyšující se poptávkou trhu po nových produktech odvozených od rostlin se *in vitro* kultury staly důvěryhodnou technikou pro masovou produkci rostlinného materiálu. Navíc potenciál použití této techniky pro produkci některých bioaktivních sloučenin, jako jsou fenolické sloučeniny, je obrovský, protože umožňuje manipulaci s biosyntetickými cestami ke zvýšení produkce a akumulace specifických sloučenin.⁵⁵

Existuje několik výhod produkce sekundárních metabolitů v buněčných kulturách rostlin než v *in vivo*. Ty například zahrnují: Produkce může být jednodušší, spolehlivější a předvídatelnější. Isolace sekundárních metabolitů může být rychlá a účinná ve srovnání se složitými extrakcemi z celých rostlin. Sloučeniny v *in vitro* kultuře mohou přímo korelovat se sloučeninami v celé rostlině. Interferující sloučeniny, které se vyskytují v rostlině pěstované na poli, mohou být v buněčných sloučeninách vyloučeny. Tkáňové a buněčné kultury mohou být význačným zdrojem definovaných standardizovaných sekundárních metabolitů ve velkém objemu. Zároveň jsou to vhodné modely pro testování elicitace. Buněčné kultury mohou být radioaktivně označeny, takže akumulované metabolity podávané ve stravě laboratorním zvířatům mohou být

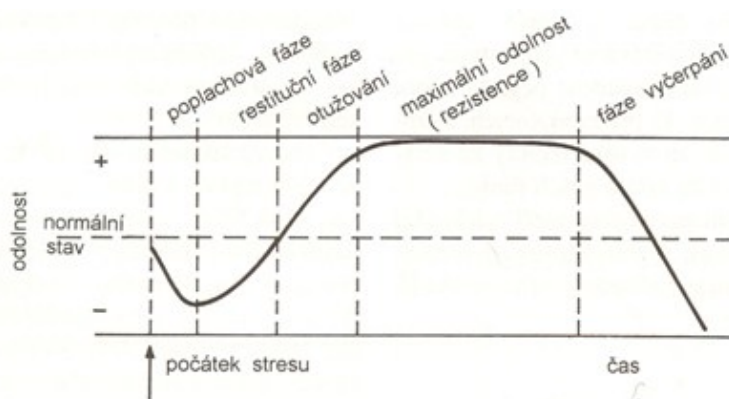
sledovány v rámci zvířecího metabolismu. Také zde nejsou žádná sezónní omezení nebo limitace hranicemi a geografickými bariérami.⁵⁶

Neorganizovaný kalus nebo suspenzní kultura většinou produkují široké spektrum sekundárních metabolitů, v jiných případech vyžaduje produkce více diferenciované výhonky nebo orgánové struktury.⁵⁷ Tato situace nastane, když metabolit zájmu je produkován specializovanou rostlinnou tkání nebo žlázou v mateřské rostlině. Příkladem může být *Panax ginseng*. Saponiny a ostatní významné metabolity jsou specificky produkovány v kořenech, proto je nutno založit kořenovou kulturu.⁵⁶ Podobně je to u rostliny *Hypericum perforatum*, jež akumuluje antidepressivní hypericiny a hyperforiny v listových žlázkách, kde se neprokázala akumulace sekundárních metabolitů v nediferencovaných buňkách.⁵⁸

Jako příklad pro posledně uvedený bod lze zmínit kalusové a suspenzní kultury rostliny *Genista tinctoria* L., jež neprodukují běžně se v rostlině vyskytující toxické alkaloidy.⁵⁹

6.3 Stresové faktory mající vliv na tvorbu a obsah sekundárních metabolitů

Obrázek 4 Idealizovaný průběh stresové reakce⁶⁰



Tvorba sekundárních metabolitů v rostlinách je významně citlivá na vlivy prostředí a napadení predátorem. Proto je proces syntézy bioaktivních sloučenin a jejich akumulace dynamický proces, jenž umožňuje rostlinám komunikovat a reagovat, aby překonaly bezprostřední hrozby.⁶¹ K přenosu signálu běžně v rostlinách dochází

prostřednictvím metabolitů, které se skládají z terpenů, fenyylpropanoidů, benzoidů a dalších těkavých sloučenin.⁶²

6.3.1 Abiotické faktory

Jedním z abiotických faktorů jsou těžké kovy. Ty mohou být introdukované mezi produkty léčivých rostlin skrze kontaminaci prostředí (půda, voda, vzduch) a/nebo špatné výrobní postupy. Pěstování léčivých rostlin v prostředí znečištěném těžkými kovy může nakonec ovlivnit biosyntézu sekundárních metabolitů, způsobující signifikantní změny v kvantitě a kvalitě těchto sloučenin. Určité léčivé a aromatické léčivé rostliny mohou absorbovat a akumulovat kovové kontaminanty ve sklizené zeleni, a proto by měla být zvažována proveditelná alternativní náprava znečištěných míst bez kontaminace silic. Rostliny využívají různé strategie a komplexní řadu různých enzymatických, neenzymatických a antioxidačních obranných systémů k vypořádání se s nadprodukcí ROS zapříčiněnou vstupem těžkých kovů, jež vnikly do buňky skrze listový nebo kořenový systém.⁶³ Rostliny totiž většinou nemají obranné mechanismy a kovy transportují neselektivně s ostatními minerály. Rostlina v prostředí těžkého kovu obvykle reaguje zpomalením růstu. Ke kumulaci kovů dochází obzvláště v kořenu rostliny. Odolnost vůči toxickým účinkům se různí. Trávy patří mezi odolnější díky vylučování organických kyselin do rhizosféry a sorpci na pektinové látky buněčných stěn. Selektivita transportních proteinů je taktéž mnohem vyšší. Tvorba stresových proteinů, proteáz, ubikvitinu a fytochelatinů je součástí obranných mechanismů při zvýšeném obsahu těžkých kovů v prostředí. Fytochelatiny jsou polypeptidické látky, jež váží těžké kovy do chelatačních komplexů a ty jsou dále náležitě inaktivovány po transportu do vakuoly interakcí s koncentrovanými kyselinami. Indukce těchto látek je závislá na přítomnosti těžkých kovů v cytosolu.⁶⁰ Využití Cu jako elicitoru prokázalo zvýšení fenolických sloučenin a ligninu u suspenzní kultury *Panax ginseng*.⁶⁴ Ale u *Camellia sinensis* došlo k poklesu fenolických látek po expozici Ni.⁶⁵

Jako stresový faktor mohou působit i některé plyny (SO₂, CO₂, ozon). Oxid siřičitý ve větších koncentracích je nebezpečný z důvodu blokace činnosti karboxylového enzymu Rubisco. Stresové hormony, flavonoidy, ethylen a polyamidy jsou důsledkem působení ozonu.⁶⁰ Vysoké koncentrace CO₂ ovlivňují tvorbu ligninu.⁶⁶

Stresový faktor vyvolávající fyzikálně chemické změny buněčných membrán a proteinů, kdy ztrácí funkčnost, je vysoká teplota nad 40 °C. To se netýká rostlin pouští a

polopouští. Buněčné membrány těchto rostlin mají odlišné složení. Obecně dochází při působení vysokých teplot k tvorbě stresových proteinů (heat shock proteins).⁶⁰

Expozice nízkým teplotám předurčuje u rostlin schopnost vyrovnat se v budoucnu s teplotami pod bodem mrazu. Změny v genové expresi vzniklé důsledkem přizpůsobení se chladovým podmínkám jsou asociovány s fyziologickými a biochemickými procesy. K poškození může docházet důsledkem vzniku extracelulárního ledu a následnou dehydratací a tvorby ROS (reaktivních forem kyslíku).⁶⁶ Opět zde dochází k fyzikálně chemickým změnám vlastností membrán (mění se na gel). Tvoří se osmoticky aktivní látky, zvyšuje se koncentrace kyseliny abscisové a syntetizují se chladové stresové hormony (cold-induced proteins). Tvorbou osmoticky aktivních látek se rostlina chrání proti vzniku ledu při teplotách pod bodem mrazu. Při obzvláště nízkých teplotách musí rostlina využít pro svou ochranu maximální dehydrataci.

Nedostatek vody je důležitým omezujícím faktorem v celosvětovém zemědělství. Voda jako důležitý element výrazně ovlivňuje růst a prospívání rostliny. Již při nízkém nedostatku se zpomaluje růst. Nedostatek vody ovlivňuje výrazným způsobem činnost enzymů. Například dochází ke snížení činnosti nitrátreduktázy. Naopak ribonukleáza a α -amyláza nabývá vyšší aktivity. Utlumuje se buněčné dělení a tvorba cytokininů. Zvýšení obsahu kyseliny abscisové v listech v důsledku nedostatku vody řídí uzavírání průduchů. Mezi důležité osmoticky aktivní látky, jejichž produkce se při nedostatku vody zvyšuje, patří aminokyselina prolin.

V jílovitých půdách nebo při vysokém zamokření může rostlina trpět nedostatkem kyslíku. Rostlina přechází na získ energie fermentačními procesy, jenž není energeticky výhodný a dále se při tomto procesu tvoří nebezpečné produkty – ethanol a kyselina mléčná.

Problém vysokého obsahu solí v půdě zatěžuje pobřežní oblasti, lokality s velkým výparem (pouště a polopouště), oblasti v blízkosti silnic ošetřovaných posypovou solí nebo dlouhodobě zavlažované.

Kyselost půd je dalším stresujícím faktorem, ale rizikovější jsou sekundární následky tohoto stavu, a tím je zesílená rozpustnost toxických sloučenin. Toxicky působí ionty Al^{3+} . V nadbytku mohou působit volné ionty Fe^{2+} a Mn^{2+} toxicky. U Ca^{2+} , Mg^{2+} a K^{+} dochází k vytěsnění kationtů ze sorpčních vazeb na koloidech a jejich

následnému vyplavení. Dostupnost fosforu a nitrátového dusíku je významně snížena. Příčinou kyselých půd je většinou nerozvážené hospodaření (nadměrná aplikace dusíkatých hnojiv, zakládání monokultur, kompletní spotřeba biomasy).⁶⁰

Další z důležitých faktorů je světlo, opět s významným vlivem na růst a tvorbu sloučenin. Při běžné dávce je světlo nezbytné, ale při excesivním působení dochází ke vzniku ROS a k následnému poškození buněčných struktur. Rostlina se brání například zvýšenou tvorbou anthokyanů.⁶⁷ Bylo prokázáno, že světlo je jeden z faktorů majících vliv na zvýšenou tvorbu ligninu.⁶⁶

Faktorem, který stále nabývá na významu je UV-B záření (280–320 nm), jehož intenzita v posledních letech narůstá. Aby se rostliny před zářením chránily, vytváří obranné štíty ve formě tlustší kutikuly a většího množství trichomů. Mimo to syntetizují i protektivní sekundární metabolity.⁶⁸ Mezi tyto sekundární metabolity lze zařadit flavonoidy, taniny a lignin.⁶⁹ Na kalusové kultuře *Genista tinctoria* L. byl testován vliv UV záření (254 a 366 nm). Bylo pozorováno, že obsah konkrétních isoflavonoidů se měnil v závislosti na vlnové délce UV záření. Oproti kontrolám se tvořil ve významnějším množství genistein, genistin, daidzein a biochanin A.⁷⁰

6.3.2 Biotické faktory

Mezi biotické faktory lze zařadit bakterie, plísňe a viry. Parazit po napadení rostliny vylučuje specifické metabolity, prostřednictvím kterých dostává rostlina signál o napadení patogenem. Specifický metabolit může být rovněž odloučen z poškozené buněčné stěny. Přes funkci druhých posílů se aktivují geny, jež zprostředkovávají obranné mechanismy. Těmito obrannými mechanismy lze rozumět produkci stresových hormonů, dále pak syntézu a shromažďování antibioticky účinných sekundárních metabolitů (terpenoidy, flavonoidy, fenolické látky, alkaloidy – fytoncidy a inhibitory). Tyto látky se běžně vyskytují v rostlině, ale při napadení se jejich obsah zvyšuje. Fytoalexiny jsou chemicky různorodé sloučeniny, jejichž tvorba je vázána na přítomnost patogenu. Příbuzné druhy rostlin tvoří podobné typy sloučenin. Pro čeled' Fabaceae jsou typické isoflavonoidy, pro Solanaceae seskviterpeny, pro Poaceae diterpeny, pro Apiaceae furanokumariny a pro Vitaceae stilbeny. Fytoalexiny jsou obvykle lipofilní látky, tudíž jejich průnik plazmatickou membránou patogenu je poměrně snadný. Další z obranných mechanismů je například nekróza vlastních buněk napadených patogeny nebo vytvoření kalózy, jež ohraničuje napadené místo.⁶⁰

Využití těchto patogenů jako elicitorů bylo už mnohokrát zkoumáno. V suspenzní kultuře tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) ošetřené *Colletotrichum lindemuthianum* došlo k nárůstu fenolických stresových metabolitů.⁷¹ U TT byly jako biotický elicitor použity mikroorganismy: několik rhizobakteriálních kmenů⁷², *Aspergillus flavus*⁷³, *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*^{74, 75}, *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* a *Botrytis cinerea*⁷⁶, *Colletotrichum gloeosporioides*.^{77, 78}

Alelopatie je další biotický faktor, který můžeme dle směřování účinku rozdělit na přímý a nepřímý. Jako přímou alelopatii můžeme nazvat děj, kdy rostlina potlačuje růst ostatních rostlin v jejím blízkém okolí pomocí látek vylučovaných kořenovým systémem. To bylo prokázáno u vodních kultur některých trav a jetelovin, kde se tvořily fenolické sekundární metabolity. Nepřímou alelopatii je děj, kdy k tvorbě potlačujících látek dochází až sekundárně mikrobiálním rozkladem odumřelých částí rostlin v půdě. Tento jev je například známý u látky juglon, díky němuž jsou opadané listy ořešáku královského (*Juglans regia*) natolik toxické.

Bezesporu můžeme do této kategorie zařadit interakci rostlin s býložravci, jež byla podnětem k morfologické a morfogenetické adaptaci ve formě trnů, vysoké

koncentraci sklerenchymatických pletiv a vysoké regenerační schopnosti. Dále se vyvinuly i biochemické mechanismy, a to tvorba účinných látek kvantitativního charakteru (látky vyvolávající toxický efekt až při určité výši obsahu) nebo kvalitativního charakteru (látky toxické v nízkých koncentracích – alkaloidy, gloukosinoláty, glykosidy).⁶⁰

6.4 *Hypericum perforatum* L. – *in vitro* elicitace

Preparáty připravované z TT patří mezi nejproblematictější, co se týče variability obsahových látek vůči uvedeným hodnotám na přípravcích z této rostliny. To je samozřejmě závažný problém pro zdravotnické výzkumníky, lékaře i pacienty. Variabilita je přisuzována fluktuaci v environmentálních podmínkách, kterým jsou rostliny vystavovány během růstu a vývoje. Pěstování TT v kontrolovaných podmínkách, jako je skleník nebo růstová komora, může odstranit širokou variaci běžných variabilit jako je vliv teploty, stavu vody, hmyzu a onemocnění. Navíc rostliny mohou být záměrně exponovány známým stresorům, kdy procesem elicitace dochází k zvýšené produkci sekundárních metabolitů. Například prostřednictvím vysoké intenzity světla došlo k navýšení metabolické produkce. Integrální řízení denního světla vedlo k produkci předvídatelného a konsistentního zisku biomasy, ale dosud nebylo spojeno s produkcí sekundárních metabolitů TT. Výzkum byl zaměřen na produkci významných sekundárních metabolitů, hypericinu, pseudohypericinu a hyperforinu, z rostlin pěstovaných v plujících hydroponických systémech v kontrolovaném prostředí při světelné intenzitě 90, 160 a 340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (při teplotě 25 °C a 16 h fotoperiodě), kde byl konstantní denní světelný integrál okolo 5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Hodnotil se růst a koncentrace metabolitů v sazenicích až po 104 dnů staré rostliny. Koncentrace hypericinu a pseudohypericinu v průběhu času nevykazovaly žádný trend. Koncentrace hyperforinu vykazovala stabilní zvýšení v čase a ošetření 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bylo konzistentně vyšší než u ostatních dvou světelných intenzit.⁷⁹

Byla testována i schopnost šesti rhizobakteriálních kmenů ke spuštění sekundárního metabolismu u sazenic TT a molekulární elicitor z nejúčinnějšího kmene, jímž byl N5.18 a byl testován na kořenových kulturách. Kmen N5.18 signifikantně zvýšil obsah hypericinu na 1,2 ppm a pseudohypericinu na 3,4 ppm (při hodnotách kontrolních vzorků 0,3 a 2,5 ppm) po dodání elicitoru do sazenic. V kořenových kulturách byl detekován pouze pseudohypericin (168,9 ppm) a signifikantní navýšení bylo detekováno u rozličných elicitorů. Hodnoty dosahovaly až 3164,8 ppm, a to po aplikaci elicitorů ve střední koncentraci s malou molekulární hmotností. Sekundární metabolismus rostlin je vysoce induktabilní díky své roli v rostlinné komunikaci a obranně. Výsledky této studie naznačují, že některé prospěšné bakteriální kmeny jsou schopny spouštět sekundární metabolismus rostlin TT, pokud jsou dodávány skrze kořeny, a bakteriální determinanty dodávané do živného média kultury jsou schopny

reprodukovat efekt v kořenových kulturách. Tyto elicitory mají značný potenciál ke zvýšení fytofarmaceutické produkce, ale je třeba dalších výzkumů.⁷²

U suspenzní kultury TT byl jako elicitor použit extrakt z mycelia houby *Aspergillus flavus*. Elicitované suspenzní kultury vykazovaly sníženou růstovou aktivitu, životaschopnost a dále i modifikovanou produkci sekundárních metabolitů. Ke stimulaci anthokyaninů docházelo pouze v suspenzních kulturách elicitovaných extraktem mycelia. Produkce sekundárních metabolitů v elicitovaných buňkách poukázala na antagonismus mezi flavonoid/naftodianthronovou a anthokyaninovou cestou. Údaje naznačují modifikaci směřování fenyylpropanoidních sloučenin.⁷³

Při elicítaci suspenzní kultury TT pomocí *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes* došlo k významnému navýšení obsahu xanthonů. Produkce fenolických sloučenin byla zřetelně méně výrazná u buněk ošetřených *A. rhizogenes*.⁷⁴

A. tumefaciens bylo taktéž využito při elicítaci buněk TT během zkoumání antioxidačních a cytoprotektivních účinků methanolických extraktů těchto buněk. V porovnání s extrakty z neelicitovaných buněk, kde nebyl prokázán ochranný účinek proti oxidačnímu poškození prostřednictvím *t*-BOOH (tert-butyl hydroperoxid), byla zaznamenána intracelulární antioxidační ochrana HepG2. Cytoprotektivní účinek extraktu elicitovaných buněk byl spojován s indukcí Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2).⁷⁵

Suspenzní kultura TT byla dále podrobena elicítaci houbovými elicitory *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* a *Botrytis cinerea*. Za použití těchto elicitorů došlo k významnému nárůstu naftodianthronů.⁷⁶

V jiné studii byl hodnocen efekt chitinu, pektinu a dextranu na suspenzní kulturu TT. Elicitace těmito polysacharidy vykazovala značně prospívající efekt na produkci fenyylpropanoidů (fenoly, flavonoidy, flavonoly a anthokyaniny) během postelicitace periody. Při použití chitinu byla zaznamenána suprese růstu. Fenyylpropanoidní akumulace elicitovaných buněk korelovala se značně vyšší enzymovou aktivitou fenyllalanin amonium lyázy a chalkon flavon izomerázy. Buňky kultur reagovaly rychle na aplikaci elicitorů skrze rychlou stimulaci naftodianthronů, hypericinu a pseudohypericinu.⁸⁰

Fenolické sloučeniny v rostlinách rodu *Hypericum*, a sice chlorogenová kyselina, rutin, hyperosid, isokvercitrin, kvercitrin a kvercetin, byly silně indukovány naočkováním houbou *Diploceras hypericinum* a bakterií *Pseudomonas putida* podporující růst rostlin. Očkování bylo provedeno na TT a *Hypericum triquetrifolium*, jež byly pěstovány ve skleníku. Výše zmíněné chemické substance mohou být zapojeny do obranného systému rostliny a implikovány jako část indukovatelné rostlinné obranné odpovědi. Výsledky této studie naznačují, že tyto fenolické sloučeniny nejsou fytoalexiny, ale fytoanticipiny, antimikrobiální sloučeniny, jež jsou přítomny v malém množství v rostlinných pletivech a jsou také indukovány patogeny a útokem býložravce.⁸¹

Dále byly také hodnoceny meristémové kultury exponované chemickým a patogenním elicitorům. Jako chemické elicitory byly zvoleny methyl jasmonát a kyselina salicylová. Zvýšené koncentrace hyperforinu byly zaznamenány po aplikaci 1 mM salicylové kyseliny a 50 μ M methyl jasmonátu. Celkové navýšení hypericinu (trojnásobně oproti kontrole) bylo zaznamenáno po aplikaci 200 μ M methyl jasmonátu po dobu 14 dní. Jako biotický elicitor byl zvolen *Colletotrichum gloeosporioides*, jenž oproti kontrole navýšil obsah hypericinů dvojnásobně po naočkování 1×10^4 spor na ml. Vyšší dávky zahltily obranný systém rostliny.⁷⁷

V další studii byl zkoumán vliv *Colletotrichum gloeosporioides* na produkci xanthonů, jejichž obsah se v elicitovaných buňkách zvedl až 12krát a to v případě, kdy byly buňky předem ošetřeny methyl jasmonátem a kyselinou salicylovou. Jednalo se o suspenzní kulturu TT.⁷⁸

Účinnost jasmonové kyseliny, jako elicitoru podporujícího navýšení obsahu hypericinu v kulturách TT byla potvrzena ve studii Walker et al., 2002, nebyla však prokázána v tomto směru účinnost kyseliny salicylové a buněčných stěn hub.⁸²

U kvetoucí rostliny *Hypericum polyanthemum* byl kvantitativně stanovován obsah uliginosinu B, antidepresivně působícího floroglucinolového derivátu, tří benzopyranů, a celkový obsah fenolických sloučenin při odpovědi v souvislosti s vystavením rostliny stresovým faktorům. Těmito stresovými faktory bylo sucho a mírné hnojení, kontinuální podávání kyseliny salicylové samostatně nebo v kombinaci s mírným hnojením a dále průběžné poškozování a expozice kyselinou salicylovou samostatně nebo v kombinaci. Sucho neovlivnilo finální rostlinnou biomasu, ale došlo k navýšení obsahu

uliginosinu B, HP1, HP3 a celkového obsahu fenolických sloučenin. Zatímco stres aplikován při mírném hnojení podmínil navýšení biomasy, uliginosinu B, HP3, byl ale bez efektu na celkový obsah fenolických sloučenin. Kontinuální aplikace 2 mM kyseliny salicylové samostatně nebo v kombinaci s mírným hnojením vyústila v obdobné navýšení uliginosinu B a celkového obsahu fenolických sloučenin. Průběžné experimenty s mechanickým poškozováním s nebo bez expozice kyseliny salicylové, stejně tak jako ošetření kyselinou salicylovou (10 mM), indukovalo syntézu uliginosinu B v listech, s vyššími hodnotami verifikovaných ve zraněných rostlinách po 2 a 7 dnech od ošetření. Akumulace benzopyranů však byla redukována nebo nebyla zasažena.⁸³

Ve studii Gadzovska et al., 2007 byla k pokusu zvolena suspenzní kultura TT pro její životnost, růst, formaci žlázek a schopnost produkovat fenylypropanoidy a naftodianthrony po elicitaci různými koncentracemi jasmonové kyseliny. V buňkách bylo pozorováno šestinásobné zvýšení obsahu fenolických sloučenin, flavanolů a flavonolů po elicitaci kyselinou jasmonovou, v porovnání byly anthokyany v menším množství v buňkách ošetřených kyselinou jasmonovou, což naznačuje modifikace ve směřování fenylypropanoidní cesty. Podobná akumulace v buňkách s maximem po 4 dnech elicitace (2,4krát) byla nalezena u naftodianthronů jako je hypericin a pseudohypericin. Nejméně šesti až osminásobné zvýšení aktivity fenylyalanin amonium lyázy a chalkon isomerázy bylo pozorováno u buněk elicitovaných kyselinou jasmonovou potvrzující silnou aktivaci fenylypropanoidní cesty. Kyselina jasmonová zvýšila produkci fenylypropanoidů a naftodianthronů v buňkách suspenzní kultury TT bez diferenciacce žlázek pod 16 hodinovou fotoperiodou.⁸⁴

Ve starších studiích autoři demonstrovali, že kořenové kultury TT konstitučně produkují xanthony ve vyšších hladinách než kořeny rostlin, a že reagují na elitaci chitosanem s pozoruhodným navýšením produkce xanthonů.^{85, 86, 87, 88} V další studii autoři hodnotili produkci xanthonů po aplikaci chitosanu jako elicitoru ve třech různých koncentracích. Opět na kořenových kulturách TT. Nejlepší výsledky byly získány podrobením kořenů jednotlivým elicitacím s 20 mg l⁻¹ chitosanu a udržováním elicitoru v médiu po dobu 7 dní. K rozlišení účinku chitosanu od účinku rozpouštědla byla do kontrolních vzorků aplikována kyselina octová ve stejné koncentraci, jež byla použita při rozpouštění chitosanu. Neočekávaně kyselina octová způsobila nárůst obsahu xanthonů srovnatelnou s odpovědí na chitosan. Experimenty s přísunem kyseliny octové

se značeným uhlíkem ^{13}C demonstrovaly, že kyselina octová není součástí inkorporace do xanthonového skeletu. Ostatní monokarboxylové kyseliny s krátkým řetězcem (propionová kyselina a máselná kyselina) mají malý nebo žádný efekt na produkci xanthonů. Tyto výsledky naznačují, že kyselina octová působí jako specifická signální molekula schopná významně podpořit biosyntézu xanthonů v kořenových kulturách TT.⁸⁹ Elicitace chitosanem byla využita i ve studii, kde byl sledován vliv na kalusovou i suspenzní kulturu TT. Obě vykazovaly zvýšený nárůst produkce xanthonů a zároveň pokles produkce flavonoidů.⁸⁶ Pozitivně byl taktéž hodnocen vliv chitosanu na kořenové kultury TT, u nichž byl zaznamenán nárůst produkce xanthonových derivátů a s tím spojená antifungální aktivita.⁸⁷

Byl taktéž zkoumán efekt kyseliny salicylové na různé formy explantátů TT. Ze získaných výsledků vychází najevo, že kyselina salicylová nemá vliv na růst a vývoj suspenzní a kalusové kultury a výhonků pěstovaných *in vitro*. Produkce hypericinu a pseudohypericinu se zdvojnásobila v elicitovaných suspenzních kulturách, ale ne v kalusových kulturách a *in vitro* pěstovaných výhoncích. Byla pozorována stimulace produkce fenylpropanoidů, jenž patří mezi nejvíce ovlivněné metabolity ošetřením *in vitro* kultur elicitory. A dále také zvýšení enzymové aktivity fenylalanin amonium lyázy a chalon izomerázy po elicitaci. Účinky elicitoru byly závislé na typu kultury, koncentraci elicitoru a době působení elicitoru. Buňky TT byly obecně citlivější k elicitaci kyselinou salicylovou, pokud byly udržovány v nediferencovaném stavu, a to zejména suspenzní kultuře. V případě absence žlázek, považovaných za místo biosyntézy naftodianthronů, byly buňky a kalusy schopny produkovat tyto sloučeniny. To znamená, že salicylová kyselina by mohla ovlivňovat úroveň biosyntézy, ale ne akumulaci hypericinu a tak i pseudohypericinu. Regulace tohoto procesu je nejspíše mnohem komplexnější než se uvádí v literatuře odkazující na odpovědnost genu Hyp-1, kódujícího biosyntetický enzym hypericinu, klonovaného a charakterizovaného z TT.⁹⁰

Z methanolických extraktů ze suspenzních, kalusových kultur a *in vitro* regenerovaných výhonků a kořenů TT bylo vyhodnoceno, že jsou schopné produkovat aktivní metabolity (hypericiny, hyperforiny a flavonoidy). Biosyntéza hypericinů je spojena s formací sekrečních žláz v regenerovaných vegetativních pupenech. V pozdějším stupni rozvoje listů je nezbytné stimulovat produkci hyperforinů nebo flavonoidů. Xanthony jsou hlavní metabolický produkt v suspenzních kulturách, v nediferencovaném kalusu a regenerovaných kořenech z rostlin nebo tvořených

kalusem. Žádné xanthony nebyly detekovány v nadzemních částech regenerovaných rostlin akumulujících hypericiny, hyperforiny a flavonoidy.⁹¹

Ve studii, v níž byla hodnocena mrazová tolerance deseti zvolených druhů rodu *Hypericum*, byl současně sledován efekt na produkci sekundárních metabolitů, konkrétně hypericinů. Z dat studie nevyšlo najevo, že by chlad měl elicitální efekt na produkci sekundárních metabolitů u rodu *Hypericum*.⁹²

Bylo zjištěno, že nízká teplota (-196 °C) stimuluje syntézu naftodianthronů a floroglucinolů u mnoho druhů rodu *Hypericum*. Studený šok moduluje polyketidovou cestu u rodu *Hypericum*. Ledové stimuly aplikované v prekryogenické fázi podporovaly kryotoleranci rodu *Hypericum*.⁹³

Výsledky další studie naznačují, že optimální nárůst biomasy by mohl být dosažen v mediu MS s 3% (w/v) koncentrací sacharózy v kořenových suspenzních kulturách. Zvýšená koncentrace sacharózy zároveň vedla k osmotickému stresu (a snížení nárůstu biomasy) a následně vyvolala akumulaci sekundárních metabolitů (fenolů, flavonoidů, kyseliny chlorogenové a hypericinů).⁹⁴

6.5 Methyl viologen

6.5.1 Obecná charakteristika methyl viologenu

IUPAC název této sloučeniny je: 1-methyl-4-(1-methylpyridin-1-ium-4-yl)pyridin-1-ium;dichloride.⁹⁵ Pro MV (methyl viologen) se využívají také synonyma: Gramoxone, Paragreen A, Paraquat.⁹⁶

Molekulová hmotnost MV se uvádí $257,158 \text{ g mol}^{-1}$.⁹⁵

Vlastnostmi je to žlutá pevná látka se slabým zápachem podobným amoniaku.⁹⁷ Fotochemicky se rozkládá působením UV záření ve vodných roztocích a je rapidně inaktivován v půdě mikrobiální činností.⁹⁸

6.5.2 Methyl viologen jako elicitor

MV bývá využíván k vyvolání oxidativního stresu. Takto byl například použit ve studii k otestování vlivu melatoninu na metabolismus chlorofylu 24 dnů starých sazenic hrachu setého (*Pisum sativum*), u něhož byl vyvolán oxidativní stres právě pomocí MV. Dle výsledků studie suplementace semen melatoninem zvyšuje schopnost sazenic hrachu setého urychlit rozpad chlorofylu a jeho *de novo* syntézu před tím, než se stresový faktor objeví, a také několik hodin poté, zatímco při prodloužené kultivaci s MV melatonin zpomaluje degradaci chlorofylu.⁹⁹

Rehmania glutinosa je léčivá rostlina, jež je tolerantní k neselektivnímu herbicidu MV. U fenolické sloučeniny – acteosidu obsaženého v této rostlině, byl pozorován inhibiční účinek na MV. Pro pochopení regulace fenylypropanoidní cesty, jež produkuje část acteosidu, byl izolován klon cDNA (RgPAL1) fenylyalanin ammonium lyázy (PAL) a byl použit ke zkoumání exprese PAL. RgPAL1 mRNA byla indukována v listech MV, H₂O₂, UV zářením, zraněním, kvasnicovým extraktem, kyselinou jasmonovou a ethephonem. Úroveň transkripce a enzymové aktivity postupně vzrůstala v rozpětí 6 až 24 hodin po expozici MV nebo kyselinou jasmonovou. Indukce RgPAL1 vyvolaná MV a stresovými fytohormony naznačuje, že je zapojen do regulace fenylypropanoidní cesty pod oxidativním stresem.¹⁰⁰

Jako elicitor byl MV použit i ve studii, jež vyhodnotila, že u ječmene transmembránová doména MLO (modulátor obrany a buněčné smrti) reaguje na biotické a abiotické stresové stimuly, mezi nimiž byl testován i MV.¹⁰¹

In vitro ošetření segmentů rýžových listů nitroprusidem sodným redukovalo únik elektrolytů, vyplývající z poškození membrán způsobeného herbicidy oxadiazonem, oxyfluorfenem, clomazonem a kombinací MV s diuronem. To naznačuje protektivní efekt oxidu dusnatého u oxidativního stresu způsobeného výše zmíněnými elicitory. Avšak při absenci stresového faktoru může způsobit vysoká koncentrace nitroprusidu sodného ztrátu intracelulárních iontů.¹⁰² Mechanismus účinku paraquatu nejspíše souvisí s tvorbou superoxidů.¹⁰³ V kombinaci s diuronem byl použit kvůli syngergismu mechanismu účinku.¹⁰⁴

Pro zvýšení tvorby sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Sylibum marianum* L. byl taktéž zkoumán vliv MV. V suspenzních i kalusových kulturách byl zvýšen obsah taxifolinu po aplikaci MV. Produkce flavolignanů však byla nízká. Příčina

tohoto jevu mohla být způsobena různými faktory (stáří kultury, nevhodnost elicitoru, živného média, růstových regulátorů).¹⁰⁵

Rostliny s mutantním AtPTR3 (PTR-type peptide transporter gene) měly zvýšenou citlivost k virulentní patogenní bakterii *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* a produkovaly více ROS, když rostly na médiu obsahující MV nebo bengálskou červeň.¹⁰⁶

MV trojnásobně indukoval CatA gen v listech mladých sazenic *Oryza sativa*, zatímco abscisová kyselina, poranění, salicylová kyselina, hydrogen peroxid měly žádný nebo pouze mírný efekt.¹⁰⁷

Ve studii zabývající se biologickou aktivitou furastanolových glykosidů, jenž stimulují adaptivní reakce spojené s aktivací na guajakolu závislé peroxidázy a potlačení lipidové peroxidace, byl taktéž jako stresový faktor použit MV. Po dobu 11 dní byly MV ošetřovány listy *Solanum tuberosum*. Furastanolové glykosidy stimulovaly obranné reakce brambor na environmentální faktory.¹⁰⁸

6.5.3 Vliv methyl viologenu na lidský organismus

Klinický účinek MV je závislý na dávce a cestě příjmu. Při požití může vyvolat pálení v ústech, nauzeu, zvracení, abdominální bolest, průjem (případně i krvavý). Po několika hodinách dochází k zánětlivé reakci a ulceraci v ústech, krku a gastrointestinálním traktu. I po požití nízkých dávek (<20 mg na kg) u asymptomatických pacientů se musí hlídat plicní funkce. U středních dávek (20–40 mg na kg) se vyskytuje renální a jaterní dysfunkce a rozvíjí se poškození plic. Po požití vysokých dávek (>40 mg na kg) dochází během 24–48 h k multiorgánovému selhání (selhání ledvin, srdeční arytmie, kóma, křeče, perforace jícnu) a následně ke smrti.¹⁰⁹

Byl zaznamenán projev příušnic po otravě pesticidy, tento projev je následkem vředu v dutině ústní vzniklým po otravě MV.¹¹⁰ V kazuistice byl také zachycen vzácný výskyt epilepsie a akutní pankreatitidy u závažné otravy MV.¹¹¹

Vzhledem k účinkům, jež molekula vykazuje (oxidativní stres a mitochondriální dysfunkce) je často spojován s výskytem Parkinsonovy nemoci.^{112, 113, 114} Byla prokázána i změna v genech související s patologií Parkinsonovy nemoci. Základní mechanismus této asociace, vliv doby trvání expozice a míra efektu jednotlivých pesticidů musí být prozkoumána v budoucích studiích.¹¹⁵

Otrava pesticidy je častá obzvláště u dětí v rozvojových oblastech s rozsáhlou zemědělskou činností.¹¹⁶ Bohužel otrava pesticidy je celosvětově jedním z hlavních způsobů sebevraždy. Legislativní omezení pesticidů, jejichž prostřednictvím bylo zakázáno používání MV, dimethoatu a fenthionu na Srí Lance, vedlo ke snížení počtu sebevražd pomocí pesticidů.¹¹⁷

Obecný léčebný postup může mít následující charakter. Samozřejmě se mění dle nových poznatků. V první řadě je však vždy důležitá dekontaminace. Potřísněnou pokožku oplachujeme silným proudem vody, při užití *per os* vypláchneme žaludek a podává se Fullerova hlínka nebo bentonit a carbo adsorbens. V dalším kroku se aplikuje magnesium sulfuricum 10% *per os*. Následuje podání dexamethasonu a cyklofosfamidu intravenózně. Do 4 hodin po požití se využívá účinků hemoperfuze trvající 6-8 hodin, později už nemá smysl.¹¹⁸ V léčebném postupu se ve světě využívají i jiné substance. V Liaocheng People's Hospital se při otravě MV například vedle základní terapie (výplach žaludku, podání methylprednisolonu, hemoperfuze) využil k ochraně srdce fruktóza fosfát, k ochraně jater magnesium isoglycyrrhizinát, k ochraně ledvin Jinshuibao kapsle,

inhibitory protonové pumpy k ochraně gastrointestinálního traktu a manitol proti kataraktě. K léčbě orálních vředů vyvolaných MV byl použit roztok gentamicinu a montmorillonitový prášek.¹¹⁰

Pro léčbu otrav MV není dostupné specifické antidotum, proto je velice žádoucí zvyšovat kvalitu léčebných metod. Bylo shlednáno, že terapie kontinuální renální substituční léčbou zlepšuje prognózu otrávených MV ve větší míře než hemoperfuze, když pacientova plasma obsahuje MV v rozsahu od 1,000 do 5,000 mg ml⁻¹. Kombinací obou těchto procedur se zvyšuje přežití pacientů otrávených MV.¹¹⁹ K léčbě otrav MV byla například kladně hodnocena prologovaná terapie methylprednisolonem, jež může snižovat mortalitu.¹²⁰

Škodlivý vliv MV lze mírnit působením mnoha prospěšných látek nebo využitím jejich protektivního charakteru. Jako příklad lze zmínit výsledky studie, jež poukazuje na ošetření LG2055 (*Lactobacillus gasseri* SBT2055), který posiluje obranný systém proti oxidativnímu stresu u savčích buněk. Oxidační stres v pokusu byl vyvolán použitím MV.¹²¹ Dále byl pozorován protektivní efekt kurkuminu u mitochondriální dysfunkce a apoptózy u buněk vystavených působení MV a v PINK1 deficientních buňkách.¹²² Také pokusy na *Caenorhabditis elegans*, u něhož byl taktéž oxidační stres vyvolán intoxikací MV, naznačují protektivní efekt proti neurotoxicitě díky antioxidační aktivitě polysacharidu EbPS-A1 izolovaného z *Epimedium brevicornum*.¹²³ Pozitivní vliv byl taktéž pozorován u benfotiaminu při oxidačním působení MV.¹²⁴ Podobně byl zjištěn ochranný účinek tanshinonu I, vyskytujícího se v *Salvia miltiorrhiza*, na mitochondrie buněk, u nichž byl oxidační stres vyvolán MV.¹²⁵

N-acetylcystein nedokázal chránit endoteliální monovrstvy před MV indukovanou toxicitou. Výsledky pokusu naznačují, že expozice MV zvyšuje paracelulární endoteliální permeabilitu zvýšením fosforylace kaveolinu-1 v závislosti na c-Src výstupu. Deplece c-Src může chránit mikrovaskulární endoteliální funkci regulací fosforylace kaveolinu-1 a přeskupování kaveolů během expozice MV a může mít potenciálně terapeutické účinky na MV indukované akutní poškození plic.¹²⁶ Podobně data další studie naznačují, že ablace Akt 2 může působit protektivně při MV vyvolané toxicitě, (jako je defekt kardiální kontrakility a apoptóza) možná skrze regulaci Nfr2 aktivace a mitochondriální homeostázi.¹²⁷ JWA gen, také známý jako ARL6IP5, má protektivní efekt při degeneraci dopaminergních neuronů. Zvýšená exprese JWA (jenž aktivovala Nfr2) chránila před akumulací ROS a zvyšovala syntézu glutathionu a

glutathion peroxidázy po aplikaci MV.¹²⁸ MyD88 zprostředkovává akutní poškození plic vyvolané MV. Knokaut tohoto genu může toto poškození zmírnit a redukovat produkci prozánětlivých cytokinů.¹²⁹ Ve studii, kde byla zkoumána fragmentace mitochondrií *in vitro* a *in vivo* způsobená MV, bylo zjištěno, že Mfn2 zabraňuje mitochondriální fragmentaci/dysfunkci a neuronální ztrátě vyvolané MV.¹³⁰

V Evropských zemích se zrušilo používání MV, přesto světově je stále aplikován díky jeho nízké ceně a vysoké účinnosti. Proto jsou významné i systémy na odstranění této látky z vody, kterou kontaminuje. Výzkum popisuje nové magnetické nanosorbenty složené z jádra magnetitu funkcionalizované bio-hybridní křemičitou skořápkou. Do této křemičité skořápky byly zavedeny biopolymery κ -karagen a škrob. Systém s κ -karagenem se prokázal jako vysoce účinný ve vychytávání MV ze znečištěné vody.¹³¹ Z dalších materiálů byl například testován montmorillonit a jeho variace – organický jíl (vzniklý interakcí montmorillonitu s tetradecylammonium chloridem) a mezoporózní montmorillonit s přidaným atomem Ti nebo bez něj. Nejlepší schopnost absorpce z těchto modifikací měl organický jíl.¹³² Dále byly zkoumány nanočástice železa stabilizované extrakty z čaje, kávy a česneku, z čehož nejvýznamnější výsledky byly viditelné pro nanočástice železa získané z čaje.¹³³

V Evropě je dle rozhodnutí Evropské komise MV vyřazen z používání od 11. 7. 2007.¹³⁴ Agentura pro ochranu životního prostředí uvádí, že v současnosti je MV registrován k použití v USA a v roce 2018 by mělo probíhat přehodnocení této registrace. Do této doby spadal MV do kategorie herbicidů s omezeným použitím, což znamená, že s ním mohou zacházet jen oprávnění pracovníci.¹³⁵

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Pomůcky a přístrojové vybavení

Autokláv PS 20 A, Chirana, Česká republika

Box s laminárním prouděním Fatran L-F, Výrobné družstvo Pokrok, Slovenská republika

Germicidní lampa UVR-Mi, Biosan Ltd, Lotyšsko

Horkovzdušný sterilizátor SVS 9/1, Chirana, Česká republika

Laboratorní analytické váhy PRLT A 13, Sartorius, Německo

Laboratorní třepačka Heidolph- Promax 2020, Heidolph Instruments, Německo

Mikrofiltry (0,20 µm), Corning NY 14831, Německo

Pipetovací balónek, Filip, Německo

Těsnění na vialky, Labicom s.r.o, Olomouc, Česká republika

Vialky, Labicom s.r.o., Olomouc, Česká republika

Vodní lázeň KL, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

Kapalinový chromatograf LC-20 Prominence, Shimadzu, Japonsko:

Kolona LiChroCART RP-18 250x4 (5µm), Merck Darmstadt, Německo (s ochranou předkolonkou a předkolonovým filtrem)

Odplyňovací jednotka DGU-20A3, Shimadzu, Japonsko

Pumpy umožňující vysokotlaký gradient LC-20AD, Shimadzu, Japonsko

Autosampler SIL-20AC HT, Shimadzu, Japonsko

Kolonový termostat CTO-20AC, Shimadzu, Japonsko

UV – VIS detektor SPD-20A, Shimadzu, Japonsko

Řídící jednotka CBM-20A, Shimadzu, Japonsko

Software LC Solution verze 1.25 SP2, Shimadzu, Japonsko

7.2 Chemikálie

Acetonitril HPLC grade, Sigma-Aldrich, USA

Ajatin plus – 10% roztok, Profarma-Produkt s.r.o., Česká republika

Destilovaná voda, Katedra analytické chemie, FaF UK v HK, Česká republika

Dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát p.a., Lachema, Česká republika

Dusičnan amonný p.a., Penta, Česká republika

Dusičnan draselný p.a., Lachema, Česká republika

Edetan sodno -železnatý p.a., Sigma-Aldrich, USA

Ethanol 96%, Lachema, Česká republika

Glycin p.a., Penta, Česká republika

Hydrolyzát kaseinu, Imuna, Slovenská republika

Chlorid kobaltnatý hexahydrát, Fluka, Švýcarsko

Chlorid vápenatý p.a., Penta, Česká republika

Jodid draselný p.a., Penta, Česká republika

Kyselina boritá p.a., Lachema, Česká republika

Kyselina fosforečná, Penta, Česká republika

Kyselina nikotinová, Sigma-Aldrich, USA

Molybdenan sodný dihydrát p.a., Penta, Česká republika

Methanol, Penta, Česká republika

Methyl viologen hydrát 98%, Sigma-Aldrich, USA

Myo-inositol, Sigma-Aldrich, USA

Pyridin p. a., Penta, Česká republika

Pyridoxin, Sigma-Aldrich, USA

Růstový stimulátor α -NAA (kyselina α -naftyl octová), Sigma-Aldrich, USA

Sacharosa p.a., Lachema, Česká republika

Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Penta, Česká republika

Síran manganatý tetrahydrát p.a., Lachema, Česká republika

Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lachema, Česká republika

Síran zinečnatý heptahydrát p.a., Penta, Česká republika

Síran železnatý heptahydrát p.a., Lachema, Česká republika

Standardy – Hyperosid, Merc, Německo

– Hypericin, HWI Analytik, Německo

– Quercetin dihydrát, Sigma-Aldrich, Německo

Thiamin, Sigma-Aldrich, USA

Superčistá voda, Katedra analytické chemie FaF UK v HK, Česká republika

7.3 Kultivace kultur *Hypericum perforatum* L. - *in vitro*

7.3.1 Rostlinný materiál

V pokusu byl použit rostlinný materiál kalusových a suspenzních kultur ze 133. až 139. pasáže.

7.3.2 Živné médium

Jako živné médium pro kultivaci kalusových a suspenzních kultur *Hypericum perforatum* L. bylo aplikováno médium dle Murashigeho a Skooga.¹³⁶ Navážky jednotlivých složek média jsou uvedeny v mg l⁻¹.

makroelementy:	CaCl ₂	332,50
	KNO ₃	1900,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00
	NH ₄ NO ₃	1650,00
	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170,00
mikroelementy:	MnSO ₄ .H ₂ O	16,90
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	11,50
	H ₃ BO ₃	6,20
	KI	0,83
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
železnatý komplex:	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84
	Na ₂ EDTA	37,34
vitamíny:	kyselina nikotinová	0,50
	pyridoxin	0,50
	thiamin	0,10
glycin		2,00
sacharosa		30000,00
myo-inositol		100,00
hydrolyzát kaseinu		1000,00

K živnému médiu byl přidán 1 ml roztoku růstového regulátoru α -NAA (kyselina α -naftyl octová). Koncentrace roztoku byla 1,00 g α -NAA na 100 ml 96% ethanolu.

Všechny složky média byly zváženy na analytických vahách nebo odebrány kalibrovanou pipetou ze zásobního roztoku a kvantitativně převedeny do odměrné baňky. Odměrná baňka se pak doplnila destilovanou vodou po rysku do objemu 1 l. Po řádném promíchání a rozpuštění jednotlivých složek bylo médium rozlito do Erlenmayerových baněk po 30 ml. Hrdla baněk byla uzavřena hliníkovou folií a následně vysterylizována v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 20 min.

7.3.3 Příprava kalusových a suspenzních kultur

Všechny Erlenmayerovy baňky se předem vymyly horkou vodou a saponátem, dále se umyté baňky opláchly destilovanou vodou a nakonec se vysušily ve sterilizátoru při 200 °C. Do baněk se zavedly papírové můstky, nalilo živné médium, uzavřely se hliníkovou folií a opět se vše sterilizovalo v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 100 kPa po dobu 20 minut. Inokulum (část kalusu z předchozí kultivace) se přenášelo pomocí pinzet, jež byly opláchnuty ethanolem a vysušené sterilizátorem při teplotě 200 °C po dobu 2 hodin.

Kalusové kultury byly pasážovány za aseptických podmínek v laminárním boxu, jenž byl vytřen 10% roztokem Ajatinu a vyzářen germicidní zářivkou. Inokulum se přenášelo pomocí sterilních pinzet do Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml s 30 ml média na papírový můstek z filtračního papíru, jejichž hrdla se následně překryla hliníkovou folií. Takto připravené kalusové kultury se kultivovaly po dobu 30 dnů v uzavřené místnosti při teplotě 25 °C při světelném režimu 16 h světlo a 8 h tma.

Suspenzní kultury vznikly mechanickým rozdrčením přeneseného inokula v Erlenmayerových baňkách s živným médiem. S překrytými hrdly hliníkovou fólií byly suspenzní kultury kultivovány v uzavřené místnosti na třepačce (120 otáček za minutu) po dobu 14 dnů při světelném režimu 16 h světlo a 8 h tma při teplotě 25 °C.

7.4 Elicitace

7.4.1 Příprava elicitoru

Použitým elicitem byl roztok methyl viologenu ve třech koncentracích. V těchto koncentracích byl přidáván v množství 1 ml ke kalusovým i suspenzním kulturám *Hypericum perforatum* L. Základní roztok byl připraven rozpuštěním 100 mg čisté látky ve 100 ml 96% ethanolu. Pro získání roztoku $3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ bylo z roztoku $3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ odebráno 10 ml a naředěno v odměrné baňce na 100 ml 96% ethanol. Dále pro naředění roztoku o koncentraci $3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ bylo z roztoku $3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ odebráno 10 ml a ty se opět naředily 96% ethanol v odměrné baňce na 100 ml. Vše probíhalo za aseptických podmínek pomocí laboratorního nádobí, jež bylo předem řádně očištěno a vysterylizováno. Konečné koncentrace roztoků byly následující:

$$C1 = 3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} = 1 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C2 = 3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} = 10 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C3 = 3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} = 100 \text{ mg/ 100 ml}$$

7.4.2 Elicitace *in vitro* kultur u *Hypericum perforatum* L.

K jednotlivému pokusu bylo vždy použito 36 baněk. Baňky s médií uzavřené hliníkovou folií byly před aplikací elicitoru ošetřeny ethanol k zamezení případné kontaminace. Aplikace probíhala ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Ten byl vždy před započnutím práce vyzářen germicidní UV lampou po dobu nejméně 60 min. Do 30 baněk byl přidán 1 ml elicitoru. Do zbylých 6 baněk, sloužících jako kontrolní vzorky, byl přidán 1 ml 96% ethanolu. Hrdla baněk se opět uzavřela hliníkovou folií. Baňky se označily časem odběru a byly přemístěny do kultivační místnosti, suspenzní kultury na třepačku.

K odběru materiálu kalusových i suspenzních kultur docházelo po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h elicítace a u kontrolních vzorků byl prováděn odběr po 12, 48 a 168 h. U kalusových kultur se pevné části přemístily pomocí pinzety na filtrační papír a nechaly se usušit za laboratorní teploty. Médium bylo slito do lahviček a zmrazeno. Takto získaný materiál sloužil k další části pokusu. U suspenzních kultur byly pevné části

získány zachycením na filtračním papíře při filtraci a usušeny za laboratorní teploty. Médium bylo taktéž slito do lahvíček a zmraženo.

7.5 Stanovení obsahu

7.5.1 Příprava vzorků k analýze

Ze získaných nasušených kalusů a zmražených medií se získaly extrakty k následné HPLC analýze. U vysušeného kalusu a suspenze byla použita dvoustupňová digesce.

Nasušené pevné části se rozmělnily pomocí třecí misky a tloučku pro zlepšení extrakce. Rozmělněné části byly zváženy na analytických vahách a navážky zaznamenány s přesností na 4 desetinná místa. Následně byl navážený materiál kvantitativně převeden do Erlenmayerovy baňky o objemu 50 ml. Do baňky bylo přidáno 10 ml 80% MeOH a varné kamínky. Směs byla extrahována pod zpětným chladičem po dobu 10 min. Poté byl extrakt zfiltrován přes chomáč vaty do odměrné baňky. Chomáč vaty i se zbytky kalusu se vložil zpět do Erlenmayerovy baňky a po přidání dalších 10 ml 80% MeOH bylo vše znovu extrahováno pod zpětným chladičem po dobu 10 min. Extrakt se přidal k první části extraktu do odměrné baňky a baňka se dolila po rysku na 25 ml 80% MeOH. Z odměrné baňky se odebralo 1,7 ml pomocí injekční stříkačky a přes nylonový mikrobiální filtr (0,20 μm) se zfiltroval do vialky. Takto získané vzorky se uchovávaly v lednici.

Ze zmražených medií se po roztání odebralo 10 ml pomocí kalibrované pipety do odpařovací misky. Na vodní lázni se médium odpařilo do sucha. Po opaření se do misky přidalo 5 ml 80% MeOH. Po občasném promíchání se ze směsi po 10 minutách odebralo 1,7 ml pomocí injekční stříkačky a přeplnilo přes nylonový mikrobiální filtr (0,20 μm) do vialky. Ty se taktéž uchovávaly v lednici před HPLC analýzou.

Z důvodu špatné rozpustnosti hypericinu bylo využito pyridinu. 1 mg hypericinu se smíchal se 2 ml pyridinu v odměrné baňce a tento roztok se doplnil methanolem do konečného objemu 200 ml. Výsledný roztok byl koncentrace 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

7.5.2 HPLC analýza vzorků

Získané vzorky byly analyzovány pomocí metody HPLC. Tato metoda slouží ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení obsahu.¹³⁷ Zde byla využita sestava Shimadzu LC-20 Prominence vybavená předkolonovým filtrem a kolonou LiChrospher RP-18 250x4 (5 μm) s ochranou předkolonkou, pumpami umožňujícími vysokotlaký gradient LC-20AD, UV-VIS detektorem SPD-20A, autosamplerem SIL-20AHT, odplynovací jednotkou DGU-20A3, kolonovým termostatem CTO-20AC, řídicí jednotkou CBM-20A a softwarem LC solution verze 1.25 SP2.¹³⁸

Detekce hypericinu se realizovala s mobilní fází tvořenou acetonitrilem (71,5 %) a kyselinou fosforečnou 0,15% (28,5 %). Průtok kolonou byl 1,5 ml min⁻¹. Jako pufr mobilní fáze zde byla zvolena kyselina fosforečná v koncentraci 0,15%. Vše probíhalo při teplotě 25 °C. Nástřik vzorků byl 20 μL .

Hyperosid a kvercetin byl detekován totožnou HPLC sestavou při teplotě 25 °C. Nástřik vzorků byl 50 μl a průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹. Mobilní fáze A byla tvořena acetonitrilem (95 %) a kyselinou fosforečnou 0,15% (5%). Mobilní fáze B pouze acetonitrilem.

Detekce probíhala prostřednictvím spektrofotometrického detektoru. Obsah sledovaných látek byl vypočten z píků při vlnové délce 590 nm pro hypericin a 254 nm pro hyperosid a kvercetin.

Standardy použité při analýze byly následující: hypericin, hyperosid, kvercetin.

7.5.3 Kalibrační křivky

Tvorba kalibrační křivky se řídila dle rovnice $y = bx + a$

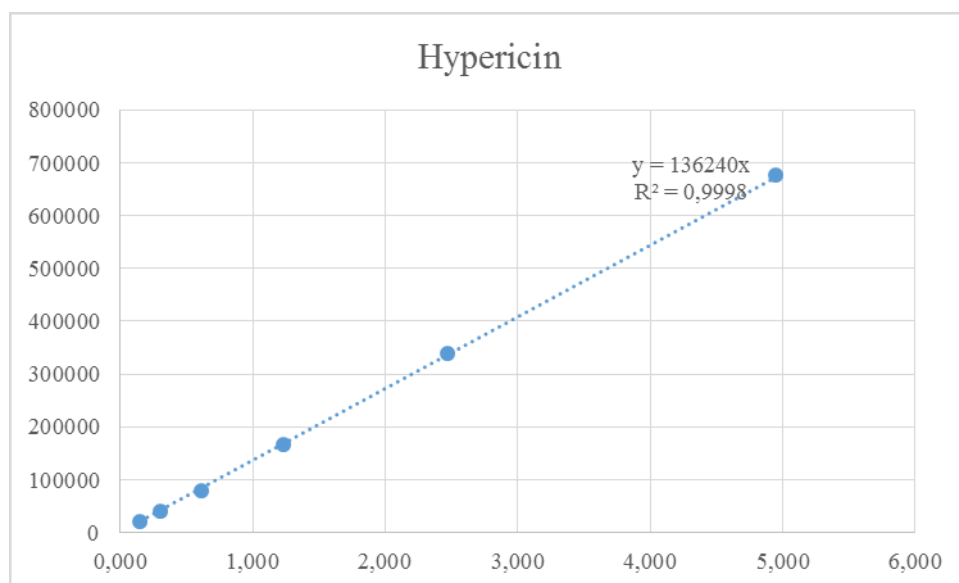
y = plocha

x = koncentrace v $\mu\text{g ml}^{-1}$

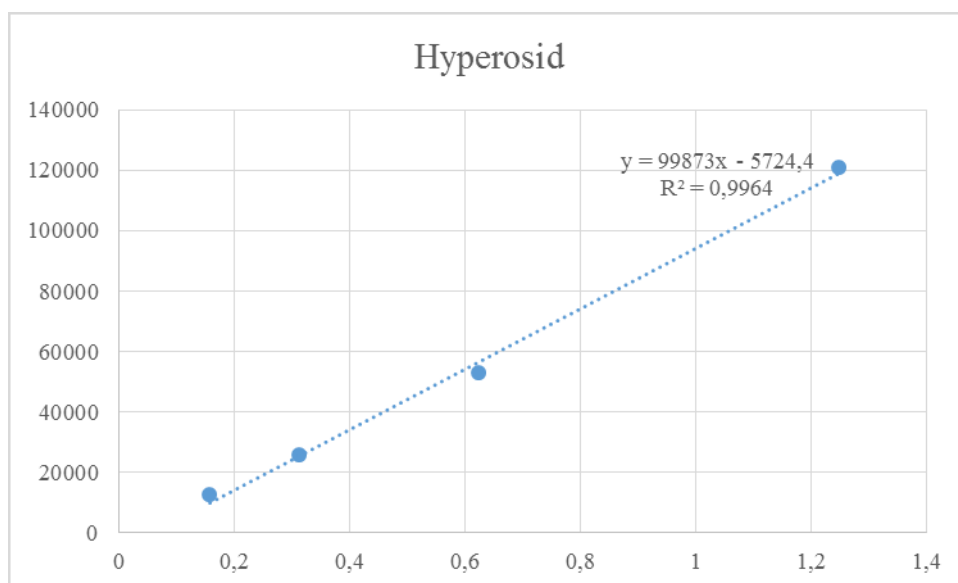
$a = 0$

b = rozličné hodnoty dle konkrétního sekundárního metabolitu

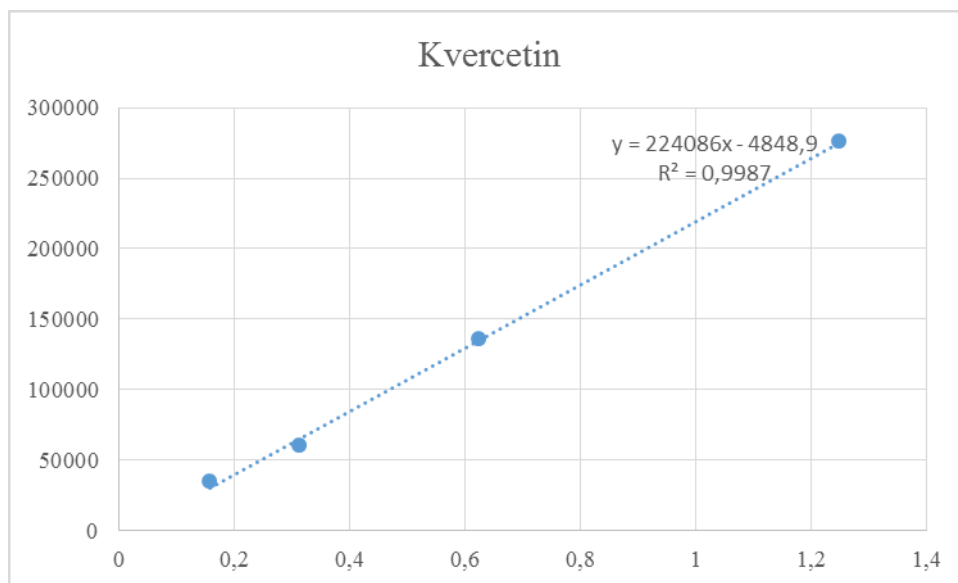
Obrázek 5 Kalibrační křivka – Hypericin



Obrázek 6 Kalibrační křivka – Hyperosid

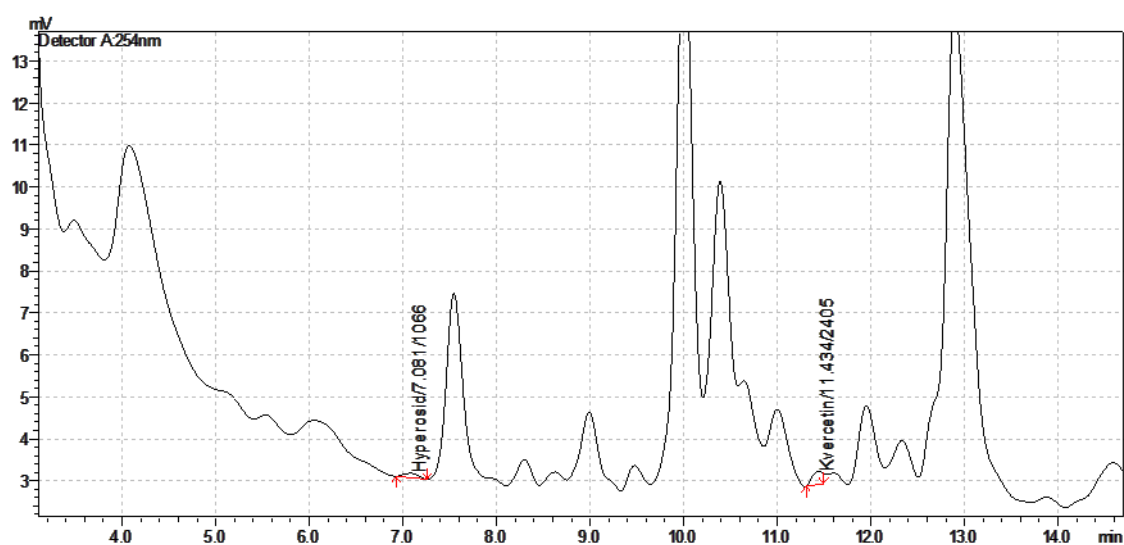


Obrázek 7 Kalibrační křivka – Kvercetin



7.5.4 Ukázka chromatogramu

Obrázek 8 Ukázka chromatogramu HPLC analýzy kontrolního vzorku suspenzní kultury odebraného po 168 h při koncentraci elicitoru $3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$



7.6 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat je podstatnou charakteristikou směrodatná odchylka. Směrodatná odchylka nám sděluje, v jaké míře se liší hodnoty od průměrné (střední) hodnoty v daném souboru.

Směrodatná odchylka je vyjádřena tímto vztahem:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

S = směrodatná odchylka

χ = hodnota sledované veličiny

$\bar{\chi}$ = průměrná hodnota sledované veličiny

n = počet členů souboru

Prostřednictvím T-testu se určuje statistická významnost dvou průměrů – v tomto případě vliv elicitoru na tvorbu sekundárních metabolitů.

Testovací kritérium je definováno tímto vztahem:

$$T = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{n_1 \cdot s_1^2 + n_2 \cdot s_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

T = testovací kritérium

m_1 = aritmetický průměr kontrolního souboru

m_2 = aritmetický průměr pokusného souboru

s_1 = směrodatná odchylka kontrolního souboru

s_2 = směrodatná odchylka pokusného souboru

n_1 = počet členů kontrolního souboru

n_2 = počet členů pokusného souboru

Testovacímu kritériu náleží t-rozdělení se stupněm volnosti.

Vztah vyjadřující počet stupňů volnosti je následující:

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

Získanému stupni volnosti v a náležité hladině významnosti p přísluší kritická hodnota $t(v)_p$, jež se porovnává s vypočtenou hodnotou testovacího kritéria získaného z T-testu. V tomto experimentu byla provedena tři paralelní měření, pro co nejpřesnější určení obsahu sekundárních metabolitů. Počet členů kontrolního a pokusného souboru je $n_1 = n_2 = 3$, proto platí $v = 4$. Při tomto počtu stupňů volnosti $v = 4$ a hladině významnosti $p = 0,05$ je kritická hodnota testovacího kritéria $t(v)_p = 2,78$. Z toho vyplývá, že statisticky významné výsledky jsou nad touto kritickou hodnotou.

Pro testovací kritérium pro odběry po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h byly jako kontrolní hodnoty zvoleny hodnoty odběru v časech 12, 48 a 168 h.

Pomocí statistického programu SigmaStat 4.0 byly všechny příslušné hodnoty náležitě zpracovány.¹³⁹

8. VÝSLEDKY

Získané vzorky se podrobily analýze metodou HPLC pro určení kvalitativního i kvantitativního obsahu flavonoidů hyperosidu a kvercetinu a naftodianthronu hypericinu. Hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách a grafech. Hypericin nebyl detekován v žádném vzorku. Množství produkovaného kvercetinu bylo oproti hyperosidu nižší. Nejvyšší dosahované hodnoty byly zaznamenány u hyperosidu v suspenzních kulturách. Sekundární metabolity byly v malém množství vylučovány i do živného média.

8.1 Tabulky

Tabulka 1 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_1

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_1	6	3,01	2,80
	12	1,94	-4,55
	12 K	2,45	x
	24	0,64	-14,91
	48	2,61	-3,18
	48 K	3,07	x
	72	1,72	-3,02
	168	3,79	6,21
	168 K	2,82	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_1	6	0,30	-1,19
	12	0	-32,04
	12 K	0,37	x
	24	0,70	20,21
	48	0	0
	48 K	0	x
	72	0	0
	168	0,32	4,264
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 2 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₂	6	3,06	-1,28
	12	3,65	0,37
	12 K	3,50	x
	24	2,01	-4,92
	48	2,00	-2,93
	48 K	2,95	x
	72	1,98	-3,07
	168	3,35	3,58
	168 K	2,42	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₂	6	0	0
	12	0	0
	12 K	0	x
	24	0	0
	48	0	0
	48 K	0	x
	72	0	0
	168	0	0
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 3 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₃

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₃	6	2,05	3,63
	12	0,97	-8,40
	12 K	1,86	x
	24	3,32	27,42
	48	1,58	-3,68
	48 K	4,82	x
	72	2,62	-2,51
	168	2,43	-13,36
	168 K	4,90	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₃	6	0	-12,70
	12	0	-12,70
	12 K	0,22	x
	24	0,37	7,20
	48	0	-20,79
	48 K	0,72	x
	72	0	-20,79
	168	0	0
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 4 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_1

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_1	6	0,0193	-9,53
	12	0,0279	-3,53
	12 K	0,0458	x
	24	0,0290	-1,77
	48	0,0648	-7,17
	48 K	0,0736	x
	72	0,0836	6,05
	168	0,0415	-8,54
	168 K	0,1145	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_1	6	0	0
	12	0	0
	12 K	0	x
	24	0,0024	20,79
	48	0	-1,73
	48 K	0,0009	x
	72	0,0008	-0,18
	168	0	0
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 5 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₂	6	0,0223	53,40
	12	0,0126	26,84
	12 K	0,0028	x
	24	0,0092	24,79
	48	0,0088	2,94
	48 K	0,0069	x
	72	0,0094	3,87
	168	0,0251	3,40
	168 K	0,0146	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₂	6	0	0
	12	0	0
	12 K	0	x
	24	0	0
	48	0	-2,12
	48 K	0,0011	x
	72	0	-2,12
	168	0	0
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 6 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_3

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_3	6	0,0182	-13,85
	12	0,0410	-3,84
	12 K	0,0583	x
	24	0,0305	-9,56
	48	0,0498	-59,28
	48 K	0,0847	x
	72	0,0446	-57,09
	168	0,0617	-0,90
	168 K	0,0639	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_3	6	0,0008	-1,81
	12	0,0008	-1,68
	12 K	0,0015	x
	24	0	-4,33
	48	0	0
	48 K	0	x
	72	0,0011	9,53
	168	0	-7,51
	168 K	0,0013	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 7 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_1

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_1	6	0,97	21,00
	12	1,16	12,56
	12 K	0	x
	24	0,84	9,70
	48	3,14	3,02
	48 K	2,34	x
	72	3,20	13,32
	168	1,82	8,91
	168 K	0,76	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_1	6	0	-7,13
	12	0,23	-4,59
	12 K	0,70	x
	24	0	-7,13
	48	0	-15,01
	48 K	2,86	x
	72	0	-15,01
	168	0	x
	168 K	0,61	-52,83

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 8 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₂	6	0,44	5,08
	12	0,51	44,17
	12 K	0	x
	24	2,33	22,42
	48	0,89	-9,63
	48 K	2,34	x
	72	3,49	31,49
	168	3,34	63,20
	168 K	0,76	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₂	6	0,11	-5,08
	12	0	-6,06
	12 K	0,70	x
	24	0,15	-4,67
	48	0,11	-74,39
	48 K	2,86	x
	72	0	-99,07
	168	0	-7,55
	168 K	0,61	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 9 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₃

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₃	6	0	-57,43
	12	0	-57,43
	12 K	0,63	x
	24	1,67	6,42
	48	2,63	154,92
	48 K	0,63	x
	72	2,50	35,13
	168	1,04	-30,98
	168 K	1,44	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₃	6	0	0
	12	0,18	6,24
	12 K	0	x
	24	0,30	2,60
	48	0	-5,40
	48 K	0,53	x
	72	0	-5,40
	168	0	-38,11
	168 K	1,98	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 10 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_1

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_1	6	0,1551	31,97
	12	0,1672	93,90
	12 K	0,0540	x
	24	0,1608	84,35
	48	0,1087	-25,55
	48 K	0,1348	x
	72	0,4033	341,92
	168	0,3762	41,44
	168 K	0,1015	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_1	6	0,0014	3,03
	12	0	0
	12 K	0	x
	24	0	0
	48	0,0038	32,91
	48 K	0	x
	72	0	0
	168	0,0014	4,85
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

Tabulka 11 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C₂

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C ₂	6	0,0665	5,47
	12	0,1753	25,92
	12 K	0,0540	x
	24	0,2297	34,66
	48	0,2066	75,41
	48 K	0,1348	x
	72	0,2468	94,10
	168	0,2575	112,390
	168 K	0,1015	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C ₂	6	0,0010	3,46
	12	0,0013	5,63
	12 K	0	x
	24	0,0014	24,25
	48	0,0008	4,62
	48 K	0	x
	72	0,0017	4,91
	168	0	0
	168 K	0	x

	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

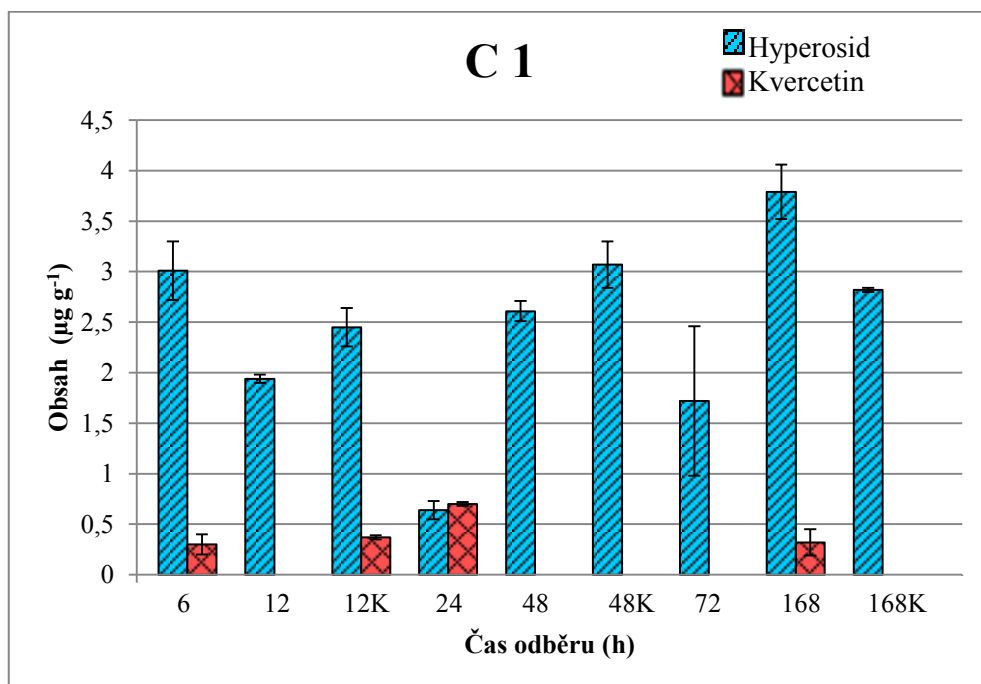
Tabulka 12 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury *Hypericum perforatum* L. při koncentraci elicitoru C_3

Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Hyperosid	
		S	T-test
C_3	6	0,0178	-99,39
	12	0,0171	-89,53
	12 K	0,1361	x
	24	0,1209	-2,77
	48	0,1091	8,96
	48 K	0,1027	x
	72	0,1886	87,67
	168	0,2353	22,06
	168 K	0,1843	x
Koncentrace elicitoru (mol l^{-1})	Hodina odběru	Kvercetin	
		S	T-test
C_3	6	0	-2,52
	12	0	-2,52
	12 K	0,0016	x
	24	0	-2,52
	48	0,0046	11,38
	48 K	0	x
	72	0,0009	5,20
	168	0	0
	168 K	0	x

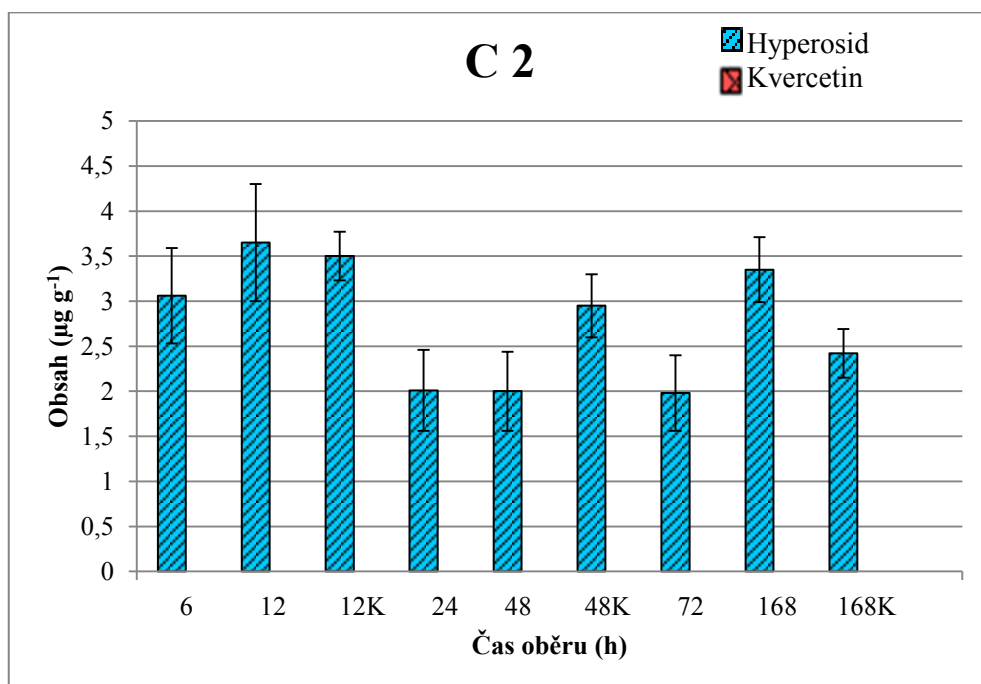
	statisticky významné zvýšené hodnoty
S	obsah ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
T-test	hodnota testovacího kritéria

8.2 Grafy

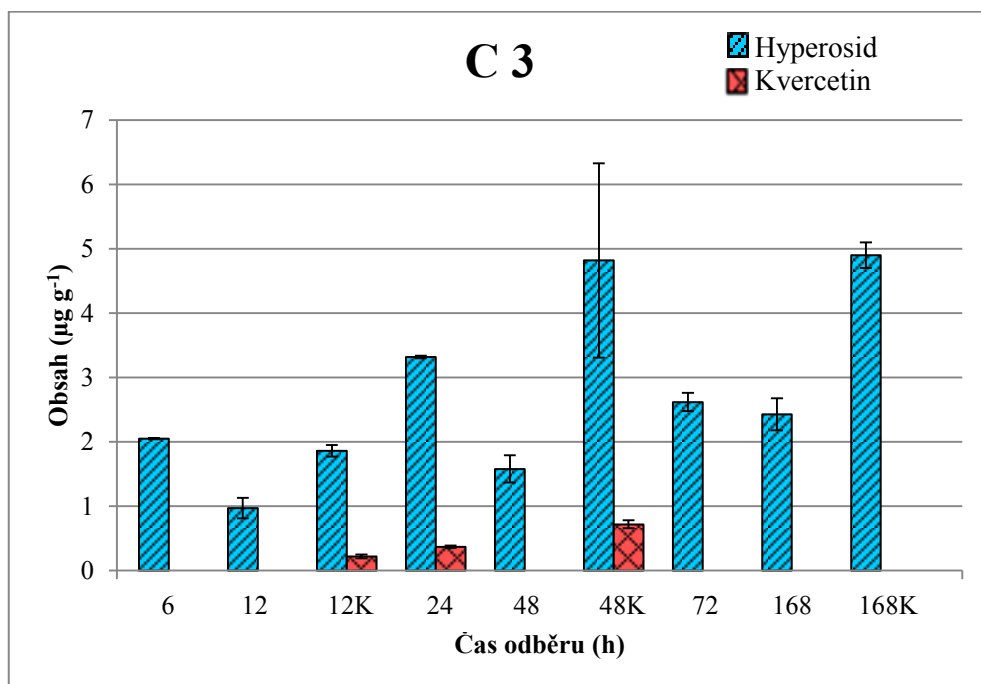
Graf 1 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_1



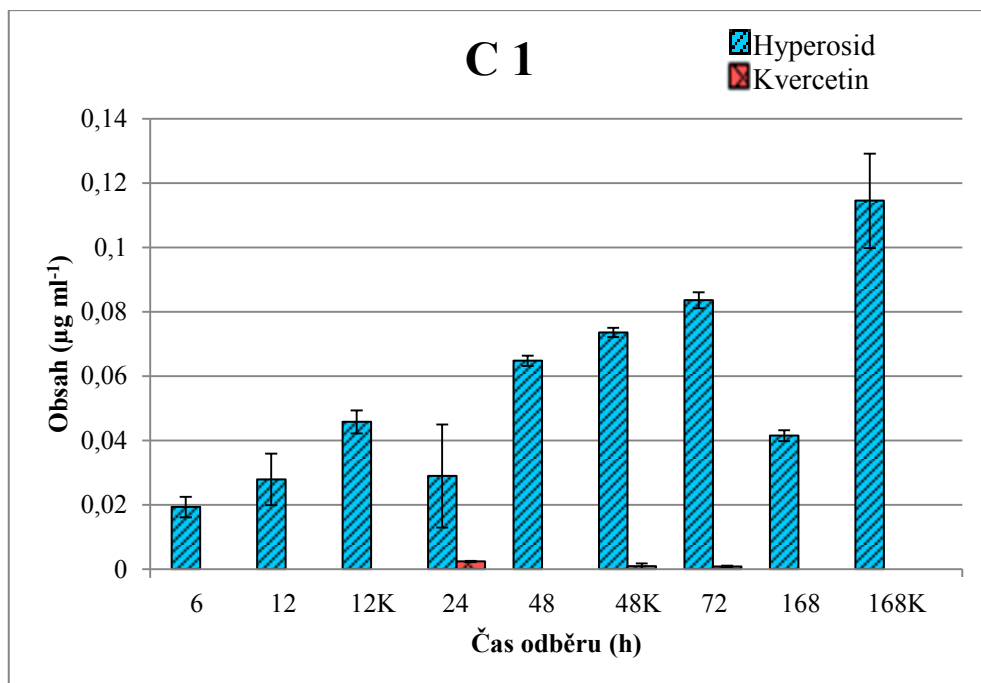
Graf 2 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_2



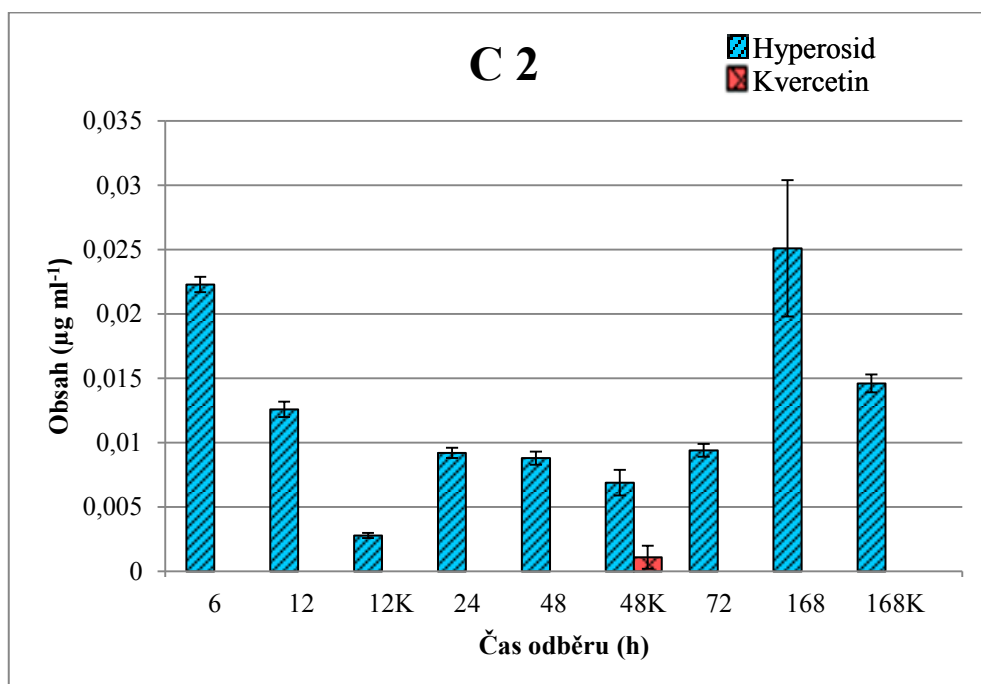
Graf 3 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_3



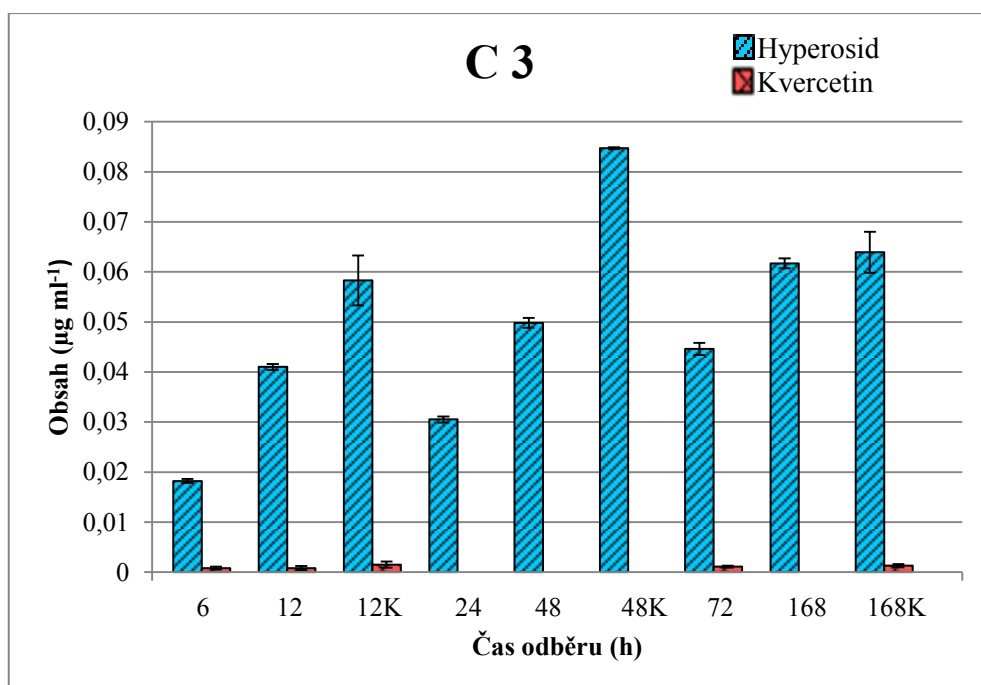
Graf 4 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_1



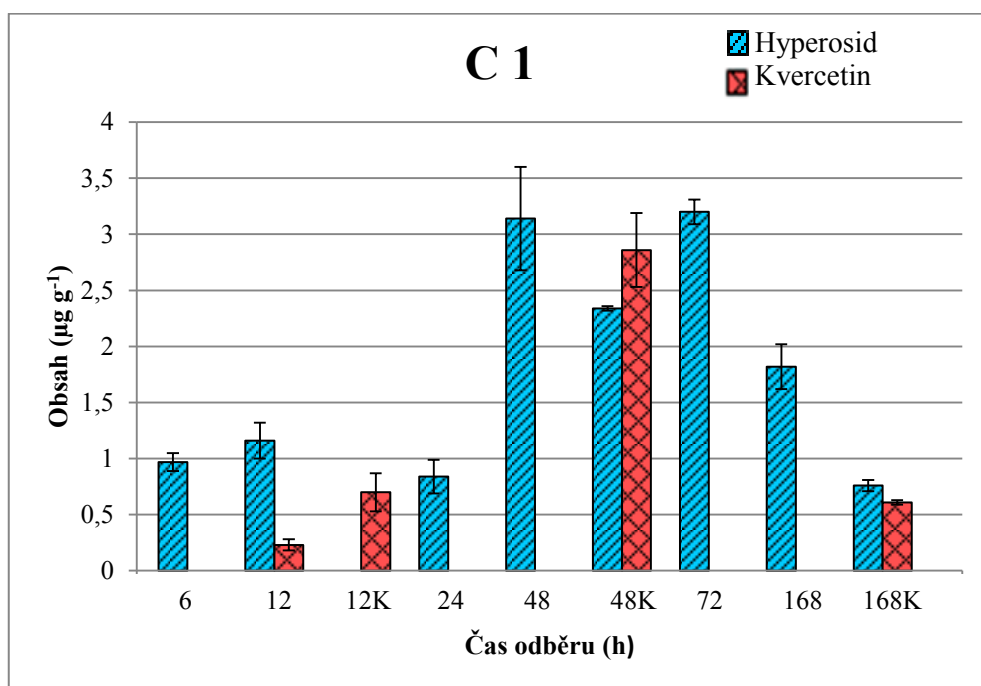
Graf 5 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_2



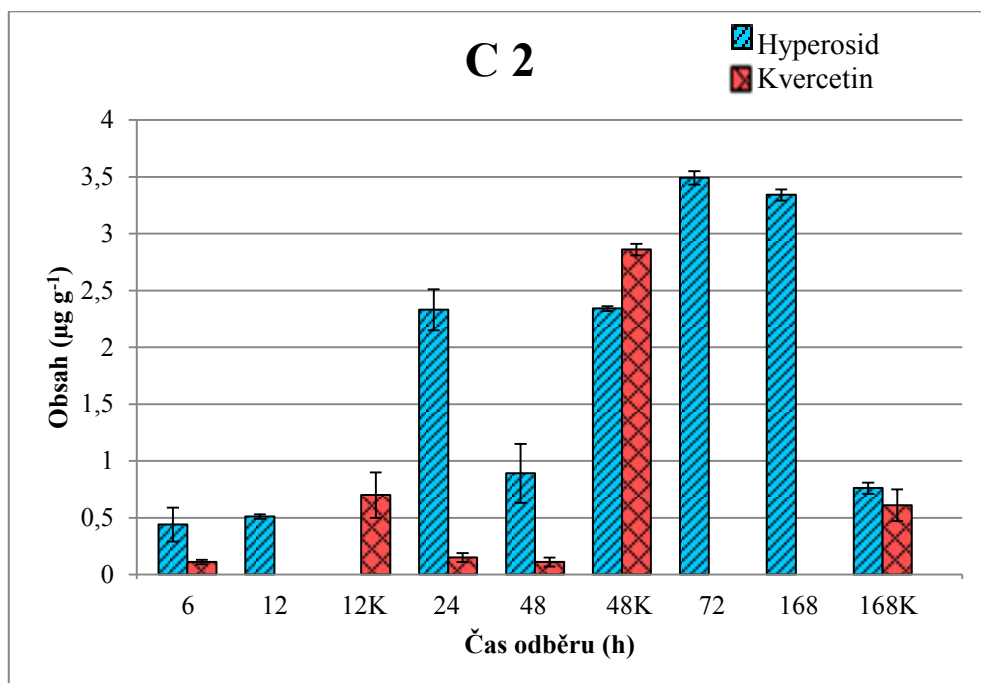
Graf 6 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_3



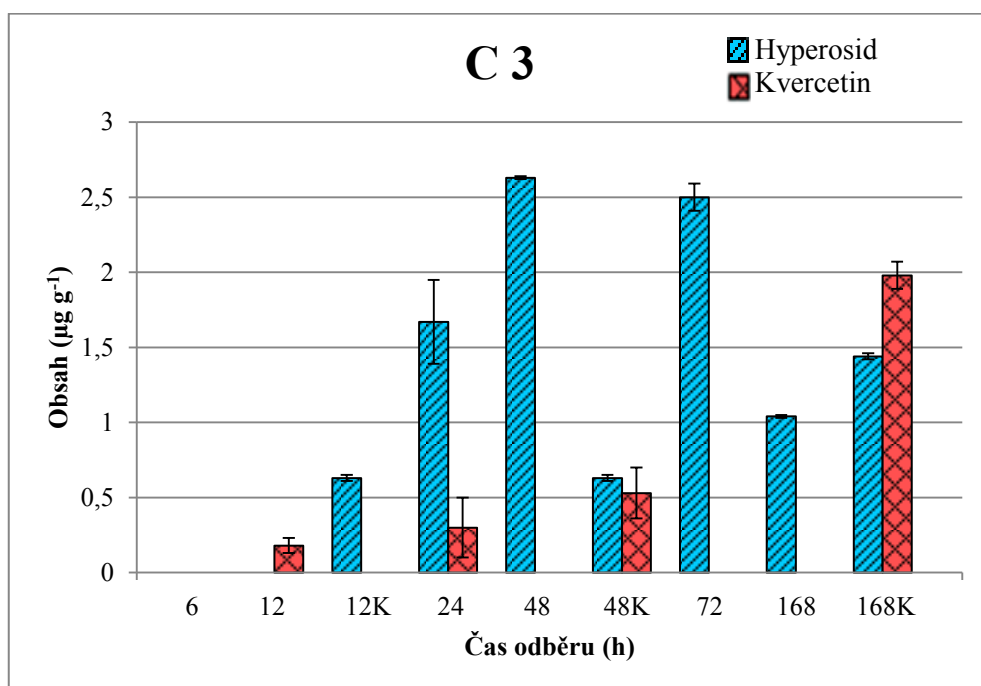
Graf 7 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_1



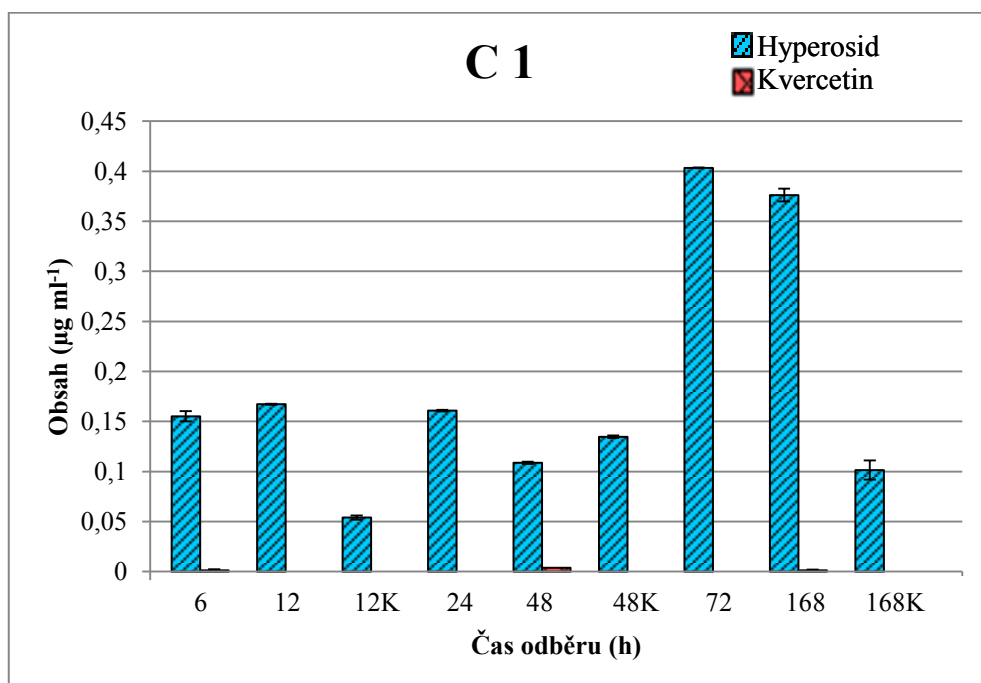
Graf 8 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_2



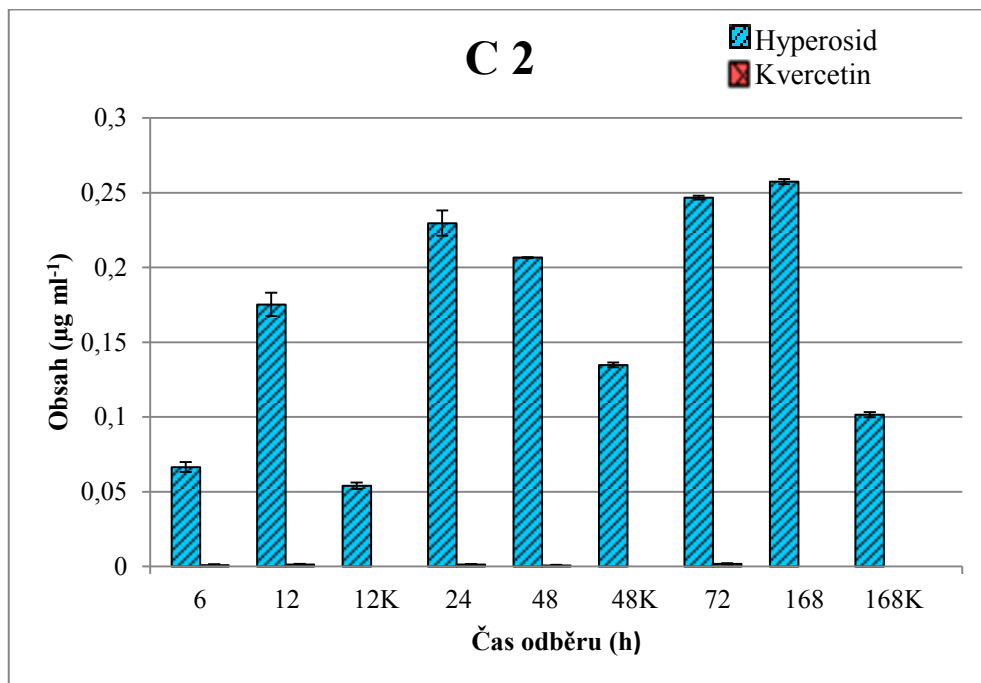
Graf 9 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_3



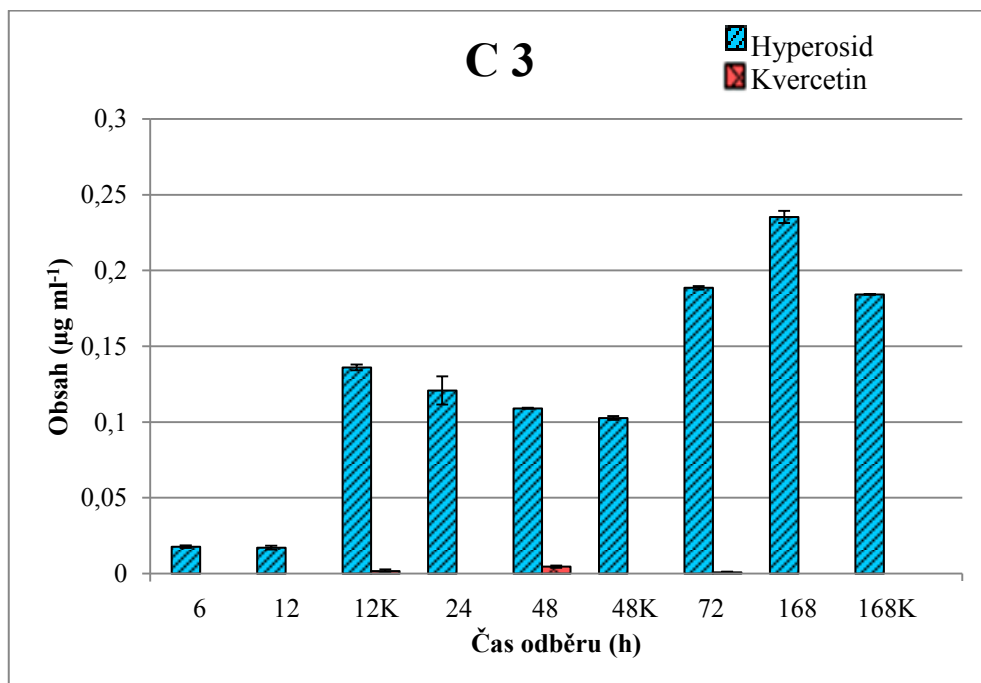
Graf 10 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_1



Graf 11 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_2



Graf 12 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_3



9. DISKUSE

Tato práce se zabývá vlivem methyl viologenu, abiotického elicitoru, na tvorbu sekundárních metabolitů u *in vitro* kultur *Hypericum perforatum* L.

Roztok tohoto elicitoru byl aplikován na kalusové a suspenzní kultury ze 133. až 139. pasáže, jež byly kultivované na živném médiu Murashigeho a Skooga. Živné médium bylo obohaceno růstovým regulátorem α -NAA v koncentraci 1,00 g na 100 ml 96% ethanolu.

Koncentrace použitého elicitoru byla následující:

$$C1 = 3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1} = 1 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C2 = 3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1} = 10 \text{ mg/ 100 ml}$$

$$C3 = 3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1} = 100 \text{ mg/ 100 ml}$$

K pokusu byly využity baňky označené časem odběru – po 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h, k nimž byl přidán 1 ml elicitoru. Souběžně byly vždy označeny i kontrolní baňky po 12, 48 a 168 h. K těmto baňkám byl přidán 1 ml čistého rozpouštědla – 96% ethanolu.

Následně se získané vzorky zpracovaly pomocí extrakce do analyzovatelných forem vzorku a byly vyhonoceny metodou HPLC.

Tato data se náležitě zpracovala pomocí statistického programu Sigmaplot 4.0 metodou T-test.

V sušině kalusové kultury bylo statisticky významné zvýšení obsahu hyperosidu zaznamenáno po 6 a 168 h působení elicitoru v koncentraci C1. Dále při koncentraci elicitoru C2 po 168 h a při koncentraci elicitoru C3 po 6 a 24 h. Z těchto statisticky významných výsledků bylo dosaženo nejvyššího nárůstu obsahu hyperosidu o 38,52 % po 24 h elicitaci MV v koncentraci C3. Další významnější navýšení obsahu hyperosidu o 25,59 % nastalo po ošetření elicitem v koncentraci C1 po 168 h a o 24,54 % po 168 h při koncentraci C2. (Tabulka 1, 2, 3; Graf 1, 2, 3)

Obsah kvercetinu v sušině kalusu po elicitaci nebyl velmi významný, často nebyl detekovatelný. Statisticky významný nárůst produkce kvercetinu byl zaznamenán pouze po elicitaci MV o koncentraci C1 po 24 h o 8,71 %, 168 h o 8,44 % a po aplikaci elicitoru v koncentraci C3 po 24 h o 3,96 %. (Tabulka 1, 3; Graf 1,3)

V malé míře byly hyperosid a kvercetin vylučovány kalusovou kulturou i do živného média. Statisticky významný nárůst jejich uvolnění do média byl zachycen u vzorků odebraných po 72 h po aplikaci elicitoru v koncentraci C1 a dále pak po 6, 12, 24, 48, 72, 168 h po elicitaci MV v koncentraci C2 u hyperosidu. U kvercetinu došlo ke statisticky významnému zvýšení obsahu po 24 h při koncentraci elicitoru C1 a po 72 h při koncentraci elicitoru C3. U těchto výše zmíněných vzorků ale nedošlo k výraznějšímu nárůstu obsahu sledovaných sekundárních metabolitů, nejvyšší nárůst obsahu byl u hyperosidu o 0,51 % při koncentraci elicitoru C2 po 6 h. (Tabulka 4, 5, 6; Graf 4, 5, 6)

U suspenzních kultur došlo ke statisticky významnému nárůstu produkce hyperosidu v sušině v rozmezí 20–30 % po působení elicitoru v koncentraci C1 ve všech sledovaných časech. Nejvyšší dosažená hodnota obsahu hyperosidu o 30,61 % byla zjištěna po 12 h od aplikace MV. Při ošetření elicitorem v koncentraci C2 byl zaznamenán velmi významný nárůst obsahu hyperosidu o 61,48 % po 24 h a o 68,07 % po 168 h a dále i po 72 h elicitaci o 30,34 %. Elicitor v koncentraci C3 vyvolal navýšení obsahu hyperosidu v čase 24 h o 27,44 %, 48 h o 52,77 % a 72 h o 49,34 %. (Tabulka 7, 8, 9; Graf 7, 8, 9)

U kvercetinu bylo zachyceno statisticky významné zvýšení jeho obsahu v sušině suspenzní kultury pouze po 12 h od aplikace elicitoru v koncentraci C3, a to o pouhých 4,75 %. (Tabulka 9; Graf 9)

V médiu suspenzní kultury bylo taktéž zaznamenáno vylučování sekundárních metabolitů hyperosidu a kvercetinu po elicitaci MV. Za použití elicitoru koncentrace C1 došlo k výraznějšímu uvolnění hyperosidu o 7,08 % v čase 72 h a o 7,25 % po 168 h. Nejvyšší obsah hyperosidu v médiu zachycený po aplikaci elicitoru v koncentraci C2 byl v čase 24 h o 4,64 % a 168 h o 4,12 %. Při koncentraci elicitoru C3 pak po 72 h o 2,27 %. (Tabulka 10, 11, 12; Graf 10, 11, 12)

Kvercetin byl v médiu suspenzní kultury zaznamenán ve velmi malé koncentraci. Navýšení obsahu bylo zpravidla pouze o několik desetin nebo setin procenta. (Tabulka 10, 11, 12; Graf 10, 11, 12)

Hypericin nebyl nalezen v žádném analyzovaném vzorku kalusové a suspenzní kultury po elitaci MV ani v kontrolních vzorcích.

Produkce hypericinu je vázána na žláznaté buňky v listech ⁵⁸, případně v regenerovaných vegetativních pupenech. V suspenzní kultuře, v nediferencovaném kalusu a regenerovaných kořenech z rostlin nebo kulturách tvořených kalusem jsou hlavními sekundárními metabolity xanthony. Nadzemní části akumulují hypericiny, hyperforiny a flavonoidy neobsahují xanthony. ⁹¹ To je nejspíše důvod, proč nediferencované buňky použité kultury neprodukuje hypericin. Ve studii Mañero et al., 2012 byla zaznamenána přítomnost pouze pseudohypericinu v kořenových kulturách TT. ⁷²

MV jako elicitor bývá využíván především jako zdroj oxidačního stresu, kdy jiná látka podporuje regeneraci ¹²⁴ a případně tvorbu sekundárních metabolitů. MV v roli elicitoru zvyšující produkci obsahových látek rostliny byl použit například ve studii Tůmová a Tůma, 2009, kde se hodnotil efekt MV na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Silybum marianum*. Obsah taxifolinu se zvýšil, avšak obsah flavolignanů byl nízký. ¹⁰⁵

Výsledky naznačují, že MV může mít elicitální účinek na zvýšení obsahu především u hyperosidu. Samozřejmě by bylo potřeba provést další měření k ověření výsledků. Řádově nízká produkce obecně může souviset se stářím kultury nebo zvolenými podmínkami.

Jako biologické elicitory byly u *Hypericum perforatum* L. v jiných experimentech použity rozličné mikroorganismy: několik rhizobakteriálních kmenů s pozitivním efektem na produkci sekundárních metabolitů. ⁷² *Aspergillus flavus* také s prokázaným efektem ovlivnění produkce sekundárních metabolitů. V tomto případě byl pozorován antagonistický efekt mezi flavonoid/naftodianthronovou a anthokyaninovou cestou. ⁷³ *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes* vedly ke zvýšení produkce xanthonů a snížení produkce fenolických sloučenin. ^{74, 75} *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* a *Botrytis cinerea* zapříčinily nárůst naftodianthronů v suspenzní kultuře TT. ⁷⁶ *Colletotrichum gloeosporioides* spolu s methyl jasmonátem a kyselinou salicylovou zvyšovaly produkci hypericinů a xanthonů. ^{77, 78} *Diploceras hypericinum* a *Pseudomonas putida* silně indukovaly produkci kyseliny chlorogenové, rutinu, hyperosidu, isokvercetin, kvercitrinu a kvercetin. ⁸¹

U chladu nebyl zjištěn elicitální efekt. ⁹²

Častými elicitory používaných u rodu *Hypericum* jsou methyljasmonát a/nebo kyselina salicylová.^{77, 78, 82, 90} Případně i v kombinaci s faktory jako hnojení, sucho a poškozování rostliny.⁸³ Kyselina jasmonová byla použita ve studii Gadzovska et al., 2007.⁸⁴ Využívaným elicitorem je také chitosan s pozitivními výsledkem.^{85, 86, 87, 88} Při hodnocení účinku chitosanu byl zdokumentován pozitivní efekt rozpouštědla – kyseliny octové na produkci sekundárních metabolitů.⁸⁹

Byly zmíněny látky, jež mohou mít protektivní efekt prostřednictvím antioxidačního účinku nebo jiného mechanismu. Tento protektivní účinek byl pozorován u LG2055¹²¹, kurkuminu¹²², EbPS-A1 izolovaného z *Epimedium brevicornum*¹²³, benfotiaminu¹²⁴, tanshinonu I¹²⁵. U TT byly dokumentovány účinky mající vliv na neurodegenerativní onemocnění, díky významným antioxidačním účinkům,³⁵ ale i významné účinky na úrovni enzymatické,⁴⁰ kdy může pozměnit metabolizaci a účinek dalších látek, a tím pádem i dopad toxické látky na organismus. Všechna tato fakta by měla být hodnocena komplexně a nezanedbatelně.

10. ZÁVĚR

Záměrem práce bylo zkoumat vliv methyl viologenu na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kultuře *Hypericum perforatum* L.

- Nejvyšší nárůst obsahu hyperosidu byl zaznamenán v suspenzní kultuře po aplikaci elicitoru v koncentraci $3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v čase 24 a 168 h. Další významné navýšení obsahu hyperosidu proběhlo za použití elicitoru v koncentraci $3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Při koncentraci elicitoru $3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ došlo také k navýšení obsahu, ale v nižším rozsahu.
- Kvercetin byl produkován v menší míře než hyperosid v kalusových i suspenzních kulturách.
- Hyperosid i kvercetin byly vylučovány do živného média v nevýznamném množství u suspenzních i kalusových kultur.
- Hypericin nebyl detekován v kalusové ani v suspenzní kultuře a ani v jejich médiu.

Výsledky poukazují na možnost zvýšení obsahu sekundárních metabolitů hyperosidu a kvercetinu jen v některých případech po elicitaci methyl viologenum.

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv methyl viologenu na produkci sekundárních metabolitů v *in vitro* kulturách *Hypericum perforatum* L.. Tento cíl byl naplněn. Současně bylo prohloubeno povědomí o explantátových kulturách.

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. ---International Plant Names Index [online]. 2005 [cit. 11. 12. 2017]. Dostupné z:
http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do;jsessionid=1A60FF0B769A634112E046E4EA94041D?id=101692-3&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Bjsessionid%3D1A60FF0B769A634112E046E4EA94041D%3Ffind_wholeName%3Dhypericum%2Bperforatum%26output_format%3Dnormal
2. Jahodář L.: *Léčivé rostliny v současné medicíně: (co Mattioli ještě nevěděl)*, str. 143. Havlíček Brain Team, 1. vyd., Praha 2010.
3. Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*, str. 66. Karolinum, 2. vyd., Praha 2006.
4. Jirásek V., Starý F.: *Atlas léčivých rostlin*, str. 104. Státní pedagogické nakladatelství, 2. vyd., Praha 1989.
5. Deyl M., Hísek K.: *Naše květiny*, str. 173–176. Academia, 3. vyd., Praha 2001.
6. Spilková J., Kašparová M., Kučerová H. et al.: Atlas mikroskopie drog: Koruna – celkový pohled [online]. 2005 [cit. 11. 12. 2017]. Dostupné z:
https://apps.faf.cuni.cz/MikroskopieDrog/imgdetail.asp?img=images/mount/middlesized/Herba_hyperici_plosne_koruna_celkovy_pohled.jpg
7. Spilková J., Kašparová M., Kučerová H. et al.: Atlas mikroskopie drog: List – celkový pohled [online]. 2005 [cit. 11. 12. 2017]. Dostupné z:
https://apps.faf.cuni.cz/MikroskopieDrog/imgdetail.asp?img=images/mount/middlesized/Herba_hyperici_plosne_list_celkovy_pohled.jpg
8. Ministerstvo zdravotnictví České republiky: *Český lékopis 2017*, 4. díl, str. 4073. Grada Publishing, a.s., Praha 2017.
9. Janča J., Zentrich J. A.: *Herbář léčivých rostlin: T–Ž*, str. 40–43. Eminent, 1. vyd., Praha 2008.
10. Spilková J., Siatka T., Tůmová L. et al.: *Farmakognozie*, str. 137. Karolinum, 1. vyd., Praha 2016.
11. Oliveira A. I., Pinho C., Sarmiento B. et al.: Neuroprotective activity of *Hypericum perforatum* and its major components. *Frontiers in Plant Science* 7, 1004 (2016).
12. Cirak C., Radusiene J., Jakstas V. et al.: Secondary metabolites of *Hypericum* species from the Drosanthe and Olympia sections. *South African Journal of Botany* 104, 82 (2016).
13. Karppinen K.: Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) – precursors and genes involved. *Acta Universitatis Ouluensis: A Scientique Rerum Naturalium* 564, (2010).
14. Niesel S., Schilcher H.: Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.); Vergleich der Freisetzung von Hypericin und Pseudohypericin in Abhängigkeit

- verschiedener Extraktions bedingungen. *Archiv der Pharmazie* 323, 755 (1990).
15. Patočka J.: The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L. *Journal of Applied Biomedicine* 1, 61 (2003).
 16. Bladt S., Wagner H.: Inhibition of MAO by fractions and constituents of *hypericum* extract. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 7, 57 (1994).
 17. Thiede H. M., Walper A.: Inhibition of MAO and COMT by *hypericum* extracts and hypericin. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 7, 54 (1994).
 18. Maisenbacher P., Kovar K. A.: Adhyperforin: A homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica* 58, 291 (1992).
 19. Chatterjee S. S., Bhattacharya S. K., Wonnemann M. et al.: Hyperforin as a possible antidepressant component of *hypericum* extracts. *Life Sciences* 63, 499 (1998).
 20. Rücker G., Manns D., Hartmann R. et al.: Peroxides as Constituents of Plants, Part 19: A C₅₀-Hydroperoxide from *Hypericum perforatum*. *Archiv der Pharmazie* 328, 725 (1995).
 21. Pietta P., Gardana C., Pietta A.: Comparative evaluation of St. John's wort from different Italian regions. *Farmaco* 56, 491 (2001).
 22. Berghoefer R., Hoelzl J.: Biflavonoids in *Hypericum perforatum*; Part 1. Isolation of I3,I18-biapigenin. *Planta Medica* 53, 216 (1987).
 23. Berghoefer R., Hoelzl J.: Isolation of I3',I18-biapigenin (amentoflavone) from *Hypericum perforatum*. *Planta Medica* 55, 91 (1989).
 24. Brantner A., Kartnig T., Quehenberger F.: Vergleichende phytochemische Untersuchungen an *Hypericum perforatum* L. und *Hypericum maculatum* Crantz. *Scientific Pharmacy* 62, 261 (1994).
 25. Nahrstedt A., Butterweck V.: Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30, 129 (1997).
 26. Borrelli F., Ernst E.: Alternative and complementary therapies for the menopause. *Maturitas* 66, 333 (2010).
 27. Kwon J., Oh K., Cho S. Y. et al.: Estrogenic Activity of Hyperforin in MCF-7 Human Breast Cancer Cells Transfected with Estrogen Receptor. *Planta Medica* 82, 1425 (2016)
 28. Kim J. K., Shin S. Y., Lee J. Y. et al.: Biapigenin, Candidate of an Agonist of Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ with Anticancer Activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 32, 2717 (2011).
 29. Jendželovská Z., Jendželovský R., Kuchárová B. et al.: Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Plant Science* 7, 560 (2016).

30. Sytar O., Švedienė J., Ložienė K. et al.: Antifungal properties of hypericin, hypericin tetrasulphonic acid and fagopyrin on pathogenic fungi and spoilage yeasts. *Pharmaceutical Biology* 54, 3121 (2016).
31. Zhu X., Ji M., Han Y. et al.: PGRMC1-dependent autophagy by hyperoside induces apoptosis and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin treatment. *International Journal of Oncology* 50, 835 (2017).
32. Liu Y. H., Liu G. H., Mei J. J. et al.: The preventive effects of hyperoside on lung cancer in vitro by inducing apoptosis and inhibiting proliferation through Caspase-3 and p53 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 381 (2016).
33. Zou L., Chen S., Li L. et al.: The protective effect of hyperoside on carbon tetrachloride-induced chronic liver fibrosis in mice via upregulation of Nrf2. *Experimental and Toxicologic Pathology* 69, 451 (2017).
34. Ye P., Yang X., Chen X. et al.: Hyperoside attenuates OVA-induced allergic airway inflammation by activating Nrf2. *International Immunopharmacology* 44, 168 (2017).
35. Nakayama M., Aihara M., Chen Y. N. et al.: Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Molecular Vision* 17, 1784 (2011).
36. Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572 (2002).
37. Gong Y., Yang Y., Chen X. et al.: Hyperoside protects against chronic mild stress-induced learning and memory deficits. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91, 831 (2017).
38. Fan H. H., Zhu L. B., Li T. et al.: Hyperoside inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells via p38 and NFκB pathways. *International Immunopharmacology* 50, 14 (2017).
39. Posadzki P., Watson L., Ernst E.: Herb-drug interactions: an overview of systematic reviews. *British Journal of Clinical Pharmacology* 75, 603 (2013).
40. Whitten D. L., Myers S. P., Hawrelak J. A. et al.: The effect of St John's wort extracts on CYP3A: a systematic review of prospective clinical trials. *British Journal of Clinical Pharmacology* 62, 512 (2006).
41. Izzo A. A.: Interactions between Herbs and Conventional Drugs: Overview of the Clinical Data. *Medical Principles and Practice* 21, 404 (2012).
42. Trana C., Toth G., Wijns W. et al.: St. John's Wort in Patients Non-responders to Clopidogrel Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: a Single-Center Randomized Open-Label Trial (St. John's Trial). *Journal of Cardiovascular Translational Research* 6, 411 (2013).
43. Lau W. C., Welch T. D., Shields T. et al.: The Effect of St John's Wort on the Pharmacodynamic Response of Clopidogrel in Hyporesponsive Volunteers and Patients: Increased Platelet Inhibition by Enhancement of

- CYP3A4 Metabolic Activity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 57, 86 (2011).
44. Gurbel P. A., Bliden K. P., Logan D. K. et al.: The Influence of Smoking Status on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel and Prasugrel. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 505 (2013).
 45. Mathijssen R. H., Verweij J., De Bruijn P. et al.: Effects of St. John's wort on irinotecan metabolism. *Journal of the National Cancer Institute* 94, 1247 (2002).
 46. Bauer S., Störmer E., John A. et al.: Alterations in cyclosporin A pharmacokinetics and metabolism during treatment with St John's wort in renal transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 55, 203 (2003).
 47. Berry-Bibee E. N., Kim M. J., Tepper N. K. et al.: Co-administration of St. John's wort and hormonal contraceptives: a systematic review. *Contraception* 94, 668 (2016).
 48. Murphy P., Bellows B., Kern S. et al.: Effects of St. John's Wort on the pharmacokinetics of levonorgestrel in emergency contraceptive (EC) dosing. *Contraception* 82, 191 (2010).
 49. Curtis K. M., Tepper N. K., Jatlaoui T. C. et al.: U.S. Medical Eligibility Criteria for Contraceptive Use. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65, 1 (2016).
 50. Frieden T. R., Briss P. A., Stephens J. W. et al.: U. S. Medical Eligibility Criteria for Contraceptive Use, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 59, 1 (2010).
 51. Rahimi R., Abdollahi M.: An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 8, 691 (2012).
 52. Bunn E., Turner S. R., Dixon K. W.: Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47, 188 (2011).
 53. Nalawade S. M., Tsay H.-S.: *In vitro* propagation of some important chinese medicinal plants and their sustainable usage. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 40, 143 (2004).
 54. Krishnan P. N., Decruse S. W., Radha R. K.: Conservation of medicinal plants of Western Ghats, India and its sustainable utilization through *in vitro* technology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47, 110 (2011).
 55. Dias M. I., Sousa M. J., Alves R. C. et al.: Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82, 9 (2016).
 56. Karuppusamy S.: A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3, 1222 (2009).

57. Dörnenberg H., Knorr D.: Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food technology* 51, 47 (1997).
58. Smith M. A. L., Kobayashi H., Gawienowski M. et al.: An *in vitro* approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70, 105 (2002).
59. Łuczkiwicz M., Migas P., Kokotkiewicz A. et al.: Two-dimensional TLC with adsorbent gradient for separation of quinolizidine alkaloids in the herb and in-vitro cultures of several *Genista* species. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* 17, 89 (2004).
60. Procházka S., Macháčková I., Krekule J.: *Fyziologie rostlin*, str. 412–431. Academia, 1.vyd., Praha 1998.
61. Bouwmeester H. J., Roux C., Lopez-Raez J. A. et al.: Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12, 224 (2007).
62. Pavarini D. P., Pavarini S. P., Niehues M. et al.: Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 176, 5 (2012)
63. Asgari-Lajayer B., Ghorbanpour M., Nikabadi S.: Heavy metals in contaminated environment: Destiny of secondary metabolite biosynthesis, oxidative status and phytoextraction in medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145, 377 (2017).
64. Ali M. B., Singh N., Shohael A. M. et al.: Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Science* 171, 147 (2006).
65. Basak M., Sharma M., Chakraborty U.: Biochemical responses of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze to heavy metal stress. *Journal of Environmental Biology* 22, 37 (2001).
66. Moura J. C. M. S., Bonine C. A. V., Viana J. O. F. et al.: Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52, 360 (2010).
67. Kimura M., Yamamoto Y. Y., Seki M. et al.: Identification of *Arabidopsis* Genes Regulated by High Light-Stress Using cDNA Microarray. *Photochemistry and Photobiology* 77, 226 (2003).
68. Yamasaki S., Noguchi N., Mimaki K.: Continuous UV-B Irradiation Induces Morphological Changes and the Accumulation of Polyphenolic Compounds on the Surface of Cucumber Cotyledons. *Journal of Radiation Research* 48, 443 (2007).
69. Rozema J., Van De Staaij J., Björn L. O. et al.: UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology* 12, 22 (1997).
70. Tůmová L., Tůma J.: The effect of UV light on isoflavonoid production in *Genista tinctoria* culture *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 635 (2011).

71. Kessmann H., Edwards R., Geno P. W. et al.: Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.): V. Constitutive and Elicitor-Induced Accumulation of Isoflavonoid Conjugates in Cell Suspension Cultures. *Plant Physiology* 94, 227 (1990).
72. Mañero F. J. G., Algar E., Gómez M. S. M. et al.: Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical Biology* 50, 1201 (2012).
73. Gadzovska-Simic S., Tusevski O., Antevski S. et al.: Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. *Archives of Biological Sciences* 64, 113 (2012).
74. Tusevski O., Stanoeva J. P., Stefova M. et al.: *Agrobacterium* enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* cell suspensions. *Plant Growth Regulation* 76, 199 (2015).
75. Carvalho A. C., Franklin G., Dias A. C. P. et al.: Methanolic extract of *Hypericum perforatum* cells elicited with *Agrobacterium tumefaciens* provides protection against oxidative stress induced in human HepG2 cells. *Industrial Crops and Products* 59, 177 (2014).
76. Gadzovska-Simic S., Tusevski O., Maury S. et al.: Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122, 213 (2015).
77. Sirvent T., Gibson D.: Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 311 (2002).
78. Conceição L. F. R., Ferreres F., Tavares R. M. et al.: Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* 67, 149 (2006).
79. Brechner M. L., Albright L. D., Weston L. A.: Impact of a variable light intensity at a constant light integral: Effects on biomass and production of secondary metabolites by *Hypericum perforatum*. *Acta Horticulturae* 2007, 221.
80. Gadzovska-Simic S., Tusevski O., Maury S. et al.: Polysaccharide elicitors enhance phenylpropanoid and naphthodianthrone production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122, 649 (2015).
81. Çirak C., Radusiene J., Aksoy H. M. et al.: Differential phenolic accumulation in two *Hypericum* species in response to inoculation with *Diploceras hypericinum* and *Pseudomonas putida*. *Plant Protection Science* 50, 119 (2014).
82. Walker T. S., Bais H. P., Vivanco J. M.: Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry* 60, 289 (2002).

83. De Matos-Nunes J., Bertodo L. O. O., Da Rosa L. M. G. et al.: Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South African Journal of Botany* 94, 182 (2014).
84. Gadzovska S., Maury S., Delaunay A. et al.: Jasmonic acid elicitation of *Hypericum perforatum* L. cell suspensions and effects on the production of phenylpropanoids and naphthodianthrones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89, 1 (2007).
85. Tocci N., Ferrari F., Santamaria A. R. et al.: Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. *Natural Product Research* 24, 286 (2010).
86. Tocci N., Simonetti G., D'Auria F. D. et al.: Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, 977 (2011).
87. Brasili E., Praticò G., Marini F. et al.: A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots. *Metabolomics* 10, 1186 (2014).
88. Brasili E., Miccheli A., Marini F. et al.: Metabolic Profile and Root Development of *Hypericum perforatum* L. In vitro Roots under Stress Conditions Due to Chitosan Treatment and Culture Time. *Frontiers in Plant Science* 7, 507 (2016).
89. Valletta A., De Angelis G., Badiali C. et al.: Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. root cultures. *Plant Cell Reports* 35, 1009 (2016).
90. Gadzovska S., Maury S., Delaunay A. et al.: The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113, 25 (2013).
91. Pasqua G., Avato P., Monacelli B. et al.: Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science* 165, 977 (2003).
92. Petijova L., Brunakova K., Zamecnik J. et al.: Relation Between Frost Tolerance and Post-Cryogenic Recovery in *Hypericum* Spp. *Cryo Letters* 35, 171 (2014).
93. Bruňáková K., Čellárová E.: Modulation of anthraquinones and phloroglucinols biosynthesis in *Hypericum* spp. by cryogenic treatment. *Journal of Biotechnology* 251, 59 (2017).
94. Cui X. H., Murthy H. N., Wu C. H. et al.: Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 103, 7 (2010).

95. ---PubChem [online]. [cit. 17. 12. 2017]. Dostupné z:
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl_viologen#section=Names-and-Identifiers
96. ---National Center for Biotechnology Information : MeSH [online]. [cit. 28. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010269>
97. ---The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards [online]. [cit. 28. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0478.html>
98. Calderbank A., Tomlinson T. E.: The Fate of Paraquat in Soils. International Journal of Pest Management: Part A 15, 466 (1969).
99. Szafrńska K., Reiter R. J., Posmyk M. M. et al.: Melatonin Improves the Photosynthetic Apparatus in Pea Leaves Stressed by Paraquat via Chlorophyll Breakdown Regulation and Its Accelerated de novo Synthesis. Frontiers in Plant Science 8, 878 (2017).
100. Lee B. K., Park M. R., Srinivas B. et al.: Induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression by paraquat and stress-related hormones in *Rehmannia glutinosa*. Molecules and Cells 16, 34 (2003).
101. Piffanelli P., Zhou F., Casais C. et al.: The Barley MLO Modulator of Defense and Cell Death Is Responsive to Biotic and Abiotic Stress Stimuli. Plant Physiology 129, 1076 (2002).
102. Silva K. S., Urban L. J. K., Balbinot A. et al.: Electrolyte Leakage and the Protective Effect of Nitric Oxide on Leaves of Flooded Rice Exposed to Herbicides. Planta Daninha 34, 777 (2016).
103. Hess F. D.: Light-dependent herbicides: an overview. Weed Science 48, 160 (2000).
104. Costa N. V., Neunfeld T. H., Ohland T. et al.: Directed-spray application of paraquat and diuron in physic nut plants. Planta Daninha 31, 987 (2013).
105. Tůmová L., Tůma J.: Ovlivnění produkce sekundárních metabolitů v buněčné kultuře *Silybum marianum* přidavkem elicitoru paraquat. Chemické listy 103, 503 (2009).
106. Karim S., Holmström K. O., Mandal A. et al.: AtPTR3, a wound-induced peptide transporter needed for defence against virulent bacterial pathogens in *Arabidopsis*. Planta 225, 1431 (2007).
107. Higo K., Higo H.: Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene, a homologue of the maize Cat3 gene. Plant Molecular Biology 30, 505 (1996).
108. Volkova L. A., Urmantseva V. V., Burgutin A. B. et al.: Stimulation of defense responses of in vitro potato plants by treatment with steroid glycosides under abiotic stresses. Russian Journal of Plant Physiology 58, 921 (2011).
109. Ashton C., Leahy N.: IPCS INCHEM [online]. 1989 [cit. 17. 12. 2017]. Dostupné z:
<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim399.htm#PartTitle:2>

110. Xu X., Yu Z., Liang Y. et al.: Mumps caused by paraquat-induced poisoning: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine* 13, 401 (2017).
111. Dong H., Peng X., Qiu Z.: A rare case of epilepsy and acute pancreatitis induced by severe paraquat poisoning. *Annals of Translational Medicine* 5, 163 (2017).
112. Tanner C. M., Kamel F., Ross G. W. et al.: Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives* 119, 866 (2011).
113. Pezzoli G., Cereda E.: Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. *Neurology* 80, 2035 (2013).
114. Chuang C. S., Su H. L., Lin C. L. et al.: Risk of Parkinson disease after organophosphate or carbamate poisoning. *Acta Neurologica Scandinavica* 136, 129 (2017).
115. Ahmed H., Abushouk A. I., Gabr M. et al.: Parkinson's disease and pesticides: A meta-analysis of disease connection and genetic alterations. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90, 638 (2017).
116. Yimaer A., Chen G., Zhang M. et al.: Childhood pesticide poisoning in Zhejiang, China: a retrospective analysis from 2006 to 2015. *BMC Public Health* 17, 602 (2017).
117. Knipe D. W., Chang S. S., Dawson A. et al.: Suicide prevention through means restriction: Impact of the 2008–2011 pesticide restrictions on suicide in Sri Lanka. *PLOS One* 12, e0172893- (2017).
118. Ševčík P., Švela K., Sas I. et al.: *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně*, str. 112–115. Grada, 2. vyd., Praha 2011.
119. Wang Y., Chen Y., Mao L. et al.: Effects of hemoperfusion and continuous renal replacement therapy on patient survival following paraquat poisoning. *PLOS One* 12, e0181207- (2017).
120. Gao J., Feng S. Y., Wang J. et al.: Prolonged methylprednisolone therapy after the pulse treatment for patients with moderate-to-severe paraquat poisoning. *Medicine* 96, e7244- (2017).
121. Kobatake E., Nakagawa H., Seki T. et al.: Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress. *PLOS One* 12, e0177106- (2017).
122. Van Der Merwe C., Van Dyk H. C., Engelbrecht L. et al.: Curcumin Rescues a PINK1 Knock Down SH-SY5Y Cellular Model of Parkinson's Disease from Mitochondrial Dysfunction and Cell Death. *Molecular Neurobiology* 54, 2752 (2017).
123. Xiang Y., Zhang J., Li H. et al.: *Epimedium* Polysaccharide Alleviates Polyglutamine-Induced Neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans* by Reducing Oxidative Stress. *Rejuvenation Research* 20, 32 (2017).
124. Vignisse J., Sambon M., Gorlova A. et al.: Thiamine and benfotiamine prevent stress-induced suppression of hippocampal neurogenesis in mice exposed to predation without affecting brain thiamine diphosphate levels. *Molecular and Cellular Neuroscience* 82, 126 (2017).

125. De Oliveira M. R., Schuck P. F, Bosco S. M. D.: Tanshinone I induces mitochondrial protection through an Nrf2-dependent mechanism in paraquat-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular Neurobiology* 54, 4597 (2017).
126. Huang Y., He Q.: Inhibition of c-Src protects paraquat induced microvascular endothelial injury by modulating caveolin-1 phosphorylation and caveolae mediated transcellular permeability. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52, 62 (2017).
127. Wang S., Zhu X., Xiong L. et al.: Ablation of Akt2 prevents paraquat-induced myocardial mitochondrial injury and contractile dysfunction: Role of Nrf2. *Toxicology Letters* 269, 1 (2017).
128. Zhao X., Wang R., Xiong J. et al.: JWA antagonizes paraquat-induced neurotoxicity via activation of Nrf2. *Toxicology Letters* 277, 32 (2017).
129. Shen H., Wu N., Wang Y. et al.: MyD88 gene knockout attenuates paraquat-induced acute lung injury. *Toxicology Letters* 269, 41(2017).
130. Zhao F., Wang W., Wang C. et al.: Mfn2 protects dopaminergic neurons exposed to paraquat both *in vitro* and *in vivo*: Implications for idiopathic Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 1863, 1359 (2017).
131. Fernandes T., Soares S., Trindade T. et al.: Magnetic Hybrid Nanosorbents for the Uptake of Paraquat from Water. *Nanomaterials* 7, 68 (2017).
132. Keawkumay C., Rakmae S., Rongchapo W. et al.: Adsorption of paraquat and pirimiphos-methyl by montmorillonite modified with tetradecylammonium chloride and intragallery templating method. *Adsorption Science & Technology* 35, 357 (2016).
133. Sukthang P., Phuinthiang P., Jindakaraked M. et al.: Plant extract-stabilized nanoiron for the treatment of aqueous paraquat in the presence of H₂O₂ and UV light. *Desalination And Water Treatment* 63, 193 (2017).
134. ---European Commission: Pesticides database [online]. [cit. 28. 4. 2018]. Dostupné z: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1669>
135. ---United States Environmental Protection Agency: Ingredients Used in Pesticide Products [online]. [cit. 28. 4. 2018]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/paraquat-dichloride>
136. Murashige T., Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473 (1962).
137. Klimeš J., Sochor J., Mokřý M. et al.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*, str. 245. Nukleus HK, 1. vyd., Hradec Králové 2011.
138. LC solution version 1.25 SP2. Shimadzu Corporation, Kjôto 2002–2011.
139. SigmaStat 4.0. Systat Software Inc., San Jose 2008.

12. PŘÍLOHY

12.1 Seznam obrázků

Obrázek 1 T. tečkovaná (<i>H. perforatum</i> L.), t. horská (<i>H. montanum</i> L.), t. chlupatá (<i>H. hirsutum</i> L.), t. rozprostřená (<i>H. humifusum</i> L.) ⁵	12
Obrázek 2 Žláзки obsahující pigment hypericin v koruním lístku ⁶	13
Obrázek 3 Žláзки obsahující pigment hypericin a sekreční dutiny v listu ⁷	13
Obrázek 4 Idealizovaný průběh stresové reakce ⁶⁰	24
Obrázek 5 Kalibrační křivka – Hypericin	52
Obrázek 6 Kalibrační křivka – Hyperosid	52
Obrázek 7 Kalibrační křivka – Kvercetin	53
Obrázek 8 Ukázka chromatogramu HPLC analýzy kontrolního vzorku suspenzní kultury odebraného po 168 h při koncentraci elicitoru $3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$	54

12.2 Seznam tabulek

Tabulka 1 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_1	58
Tabulka 2 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_2	59
Tabulka 3 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v kalusové kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_3	60
Tabulka 4 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_1	61
Tabulka 5 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_2	62
Tabulka 6 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_3	63
Tabulka 7 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_1	64
Tabulka 8 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_2	65
Tabulka 9 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) v suspenzní kultuře <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_3	66
Tabulka 10 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_1	67
Tabulka 11 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_2	68
Tabulka 12 Obsah jednotlivých flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury <i>Hypericum perforatum</i> L. při koncentraci elicitoru C_3	69

12.3 Seznam grafů

Graf 1 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_1	70
Graf 2 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_2	70
Graf 3 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v kalusové kultuře při koncentraci elicitoru C_3	71
Graf 4 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_1	71
Graf 5 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_2	72
Graf 6 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu kalusové kultury při koncentraci elicitoru C_3	72
Graf 7 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_1	73
Graf 8 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_2	73
Graf 9 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DW}$) v suspenzní kultuře při koncentraci elicitoru C_3	74
Graf 10 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_1	74
Graf 11 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_2	75
Graf 12 Obsah flavonoidů ($\mu\text{g ml}^{-1}$) v médiu suspenzní kultury při koncentraci elicitoru C_3	75

12.4 Abstrakt

Tato studie se zabývá vlivem methyl viologenu na produkci sekundárních metabolitů v kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. Sledovanými sekundárními metabolity byly hyperosid, kvercetin a hypericin.

K elicitaci byl použit methyl viologen ve třech koncentracích: $3,6341 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; $3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a $3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, jenž se přidával ke kalusové a suspenzní kultuře *Hypericum perforatum* L. Jako živné médium bylo zvoleno MS médium s přidavkem růstového regulátoru 10 g l^{-1} α -NAA (α -naftyloctové kyseliny). Kultivace s elicitorem probíhala po dobu 6, 12, 24, 48, 72 a 168 hodin. Odebrané vzorky sušiny i média se dále zpracovávaly pomocí HPLC analýzy.

Nejvýznamnější nárůst produkce byl zaznamenán u hyperosidu po aplikaci elicitoru v koncentraci $3,6341 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ v čase 24 a 168 hodin v suspenzní kultuře. K dalšímu významnému navýšení obsahu hyperosidu došlo po použití elicitoru v koncentraci $3,6341 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v suspenzní kultuře. Produkce kvercetinu nebyla po elitaci methyl viologenum významně zvýšená. Hyperosid i kvercetin byly vylučovány v malé míře do živného média u kalusové i suspenzní kultury. V kalusové ani suspenzní kultuře a ani v jejich živném médiu nebyl detekován hypericin.

Výsledky studie naznačují schopnost methyl viologenu zvyšovat produkci některých sekundárních metabolitů.

12.5 Abstract

The study examined the effect of methyl viologen on production of secondary metabolites in callus and suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. The monitored secondary metabolites were hyperosid, quercetin and hypericin.

For elicitation was used methyl viologen in three concentrations: $3.6341 \cdot 10^{-5}$ mol l⁻¹; $3.6341 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ a $3.6341 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹. As a nutrient medium was chosen MS medium with addition of growth regulator 10 g l⁻¹ α -NAA (α -naphthylacetic acid). Cultivation with the elicitor lasted for 6, 12, 24, 48, 72 and 168 hours. The samples of dry weight and medium was analyzed by HPLC.

The highest hyperosid production was detected after elicitor treatment in concentration of $3.6341 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹ after 24 and 168 hours in suspension culture. Another efficient production was detected after elicitor application in concentration of $3.6341 \cdot 10^{-3}$ mol l⁻¹ in suspension culture. Production of quercetin was not so significant. Hyperosid and quercetin were released into a nutrient medium of callus and suspension culture, but in a small amount. The hypericin was not detected in callus and suspension culture and in their nutrient medium.

The results of this study indicate that the methyl viologen can increase production of some secondary metabolites.